

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Trafic intracellulaire en présence de vésicules de membrane externe produites par *Brucella abortus* 2308

Gille, Alizée

Award date:
2010

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**TRAFIC INTRACELLULAIRE EN PRESENCE DE VESICULES DE MEMBRANE
EXTERNE PRODUITES PAR *BRUCELLA ABORTUS* 2308**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Alizée GILLE

Janvier 2010

Trafic intracellulaire en présence de vésicules de membrane externe produites par *Brucella abortus* 2308

GILLE Alizée

Résumé

Les vésicules de membrane externe (OMVs) sont produites par une grande variété de bactéries à Gram négatif. La communauté scientifique s'intéresse depuis peu à leurs rôles possibles de « comunicasomes » intercellulaires qui autoriseraient l'établissement d'interactions avec d'autres bactéries de la même espèce ou non, mais également avec des cellules eucaryotes. Les OMVs produites par *Legionella pneumophila* ont récemment été décrites comme étant impliquées dans le processus d'inhibition de la fusion entre les phagosomes et les lysosomes (Fernandez-Moreira et al., 2006). Comme *Brucella* parvient à dévier la voie endosomale classique pour établir sa niche répliquative, ces données nous autorisent à postuler que des OMVs produites par *Brucella* pourraient moduler le trafic intracellulaire, en adressant, par exemple, des composés bactériens à la cellule infectée.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'étude du rôle potentiel des OMVs de *Brucella*. Tout d'abord, un protocole de purification des OMVs de *Brucella abortus* 2308 a été élaboré. Après une caractérisation initiale de la composition des OMVs, nous avons tenté d'étudier le devenir des OMVs dans la cellule, après endocytose, en utilisant la technique du fractionnement subcellulaire par centrifugations. Après avoir mis en évidence l'internalisation des OMVs par les macrophages, nous avons constaté une évolution de la distribution intracellulaire des OMVs au fil du temps, sans pouvoir identifier les compartiments qui accueillent les OMVs lors des temps d'endocytose les plus longs. Ensuite, nous nous sommes penchés sur l'impact potentiel que pourrait avoir les OMVs sur le trafic phagocytaire. Nous avons constaté qu'en présence d'OMVs, les macrophages voient leur capacité phagocytaire diminuer. Enfin, des modifications morphologiques des macrophages, lorsqu'ils sont en contact avec des OMVs, ont été décrites. Ce projet laisse entrevoir de nombreuses perspectives, maintenant que nous avons établi le protocole de purification des OMVs, et que nous avons constaté certains effets biologiques des OMVs sur les macrophages. Pour la suite, une attention particulière devrait être portée sur l'implication relative des LPS et des composants protéiques des OMVs dans les processus biologiques qu'ils déclenchent. Espérons que ce projet puisse, à l'avenir, aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes mis en place par *Brucella* lors du processus infectieux.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2010

Promoteur: M. Jadot

Co-promoteur: X. De Bolle

Tuteur: A-C. Beguin

Liste des abréviations :

ADN	Acide désoxyribonucléique
ASR	Activité spécifique relative
BCV	Vacuole contenant <i>Brucella</i> (<i>Brucella</i> Containing Vacuole)
BSA	Albumine de sérum bovin
BSL3	Biosafety level 3 (niveau de biosécurité 3)
DHG	DMEM high glucose
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
FBS	Sérum fœtal de bovin
FSR	Fluorescence spécifique relative
HRP	Horse radish peroydase
ISR	Intensité spécifique relative
kDa	KiloDalton
LPS	Lipopolysaccharides
OMPs	Protéines de membrane externe
OMVs	Vésicules de membrane externe
PBS	Tampon phosphate salin
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrilamide en présence de sodium dodécyl sulfate
TLR	Toll like receptor
WT	Sauvage ou « wild type »

Table des matières

TABLE DES MATIERES	4
AVANT-PROPOS	6
1. LES INTERACTIONS HOTE-PATHOGENE BACTERIEN	6
1.1. <i>L'infection bactérienne</i>	6
1.2. <i>La réponse de l'hôte</i>	6
INTRODUCTION	9
1. LA PHAGOCYTOSE	9
2. LA VOIE PHAGOLYSOSOMALE	9
3. BRUCELLA SPP.	11
3.1. <i>Généralités</i>	11
3.2. <i>Taxonomie</i>	12
3.3. <i>La brucellose</i>	13
3.4. <i>Pathogénie</i>	14
3.5. <i>Les facteurs de virulence</i>	15
3.6. <i>Le trafic intracellulaire de Brucella</i>	15
4. LES VESICULES DE MEMBRANE EXTERNE	18
4.1. <i>Généralités</i>	18
4.2. <i>Biogenèse des vésicules</i>	19
4.3. <i>Rôles des OMVs</i>	20
4.4. <i>Trafic intracellulaire des OMVs</i>	21
4.5. <i>Brucella et les OMVs</i>	21
OBJECTIFS DU MEMOIRE	23
MATERIEL ET METHODES	24
1. CULTURE CELLULAIRE	24
2. DOSAGE DE PROTEINES	24
3. PURIFICATION DES OMVs DE BRUCELLA ABORTUS 2308	24
3.1. <i>Notre protocole</i>	24
3.2. <i>Protocole du laboratoire du Pr. I. Moriyon (Plamplona, Espagne)</i>	25
4. PURIFICATION DES LPS DE B. ABORTUS 2308	25
5. DOSAGE DE LPS	26
6. IMMUNOFLUORESCENCE	26
7. WESTERN-BLOT	26
7.1. <i>Méthode ECL plex</i>	27
7.2. <i>Méthode HRP</i>	27
8. DOT BLOT	27
8.1. <i>Méthode HRP</i>	27
8.2. <i>Méthode infrarouge</i>	28
9. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	28
10. MESURES DE LA CAPTURE PHAGOCYTAIRE	28
11. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE	28
11.1. <i>Centrifugation différentielle</i>	29
11.2. <i>Centrifugation isopycnique</i>	29
12. DOSAGES ENZYMATIQUES	30
12.1. <i>β-galactosidase</i>	30
12.2. <i>α-glucosidase alcaline</i>	30

12.3. <i>Cytochrome oxydase</i>	30
12.4. <i>Catalase</i>	30
13. ETUDE DE L'INTERNALISATION DES OMVs PAR LES CELLULES RAW 264,7.....	30
14. DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DES OMVs DANS LES CELLULES RAW 264,7.....	31
15. MICROSCOPIE A CONTRASTE DE PHASE.....	31
RESULTATS ET DISCUSSION	32
1. PURIFICATION DES OMVs	32
2. TRAFIC INTRACELLULAIRE DES OMVs.....	33
2.1. <i>Endocytose des OMVs</i>	33
2.2. <i>Distribution intracellulaire des OMVs</i>	34
3. MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES DES CELLULES EN PRESENCE D'OMVs.....	45
4. EFFET DES OMVs SUR LA CAPTURE PHAGOCYTAIRE DE PARTICULES INERTES	48
5. INFLUENCE DES OMVs SUR LE TRAFIC INTRACELLULAIRE DE PARTICULES INERTES	52
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	58
BIBLIOGRAPHIE	62

Avant-propos

1. Les interactions hôte-pathogène bactérien

La diversité des maladies infectieuses résulte de l'extrême variété des microorganismes pathogènes qui les provoquent, mais aussi de la nature des réponses de l'organisme hôte. Les différentes étapes de l'infection bactérienne, et la réponse immune développée par l'hôte seront abordées ci dessous avec, toutefois, une attention particulière portée sur la phagocytose des pathogènes et le devenir du matériel phagocyté.

1.1. L'infection bactérienne

La première étape de l'interaction hôte-bactérie est la pénétration des microorganismes dans l'organisme hôte, ou l'infection. Souvent, le pathogène est transmis directement d'un hôte à un autre (toux, éternuement, contact direct), mais il peut également être transmis par ingestion de nourriture ou d'eaux contaminées.

Après inoculation de la bactérie, a lieu la deuxième étape qui est celle de la colonisation. Cette étape a pour but l'établissement d'un site de réplication approprié à la bactérie, au sein de l'hôte. Il est alors important de pouvoir distinguer les bactéries extracellulaires et intracellulaires, qui procèdent d'une manière totalement différente pour arriver à leurs fins. Les premières se multiplient au sein du tissu interstitiel et les deuxièmes le font à l'intérieur des cellules. L'objectif premier des bactéries est d'atteindre un environnement propice (pH, éléments nutritifs, température,...) à leur réplication au sein de l'hôte. Les bactéries ont sélectionné, pour atteindre cette niche, des facteurs de virulence très diversifiés : production de toxines, facteurs d'adhérence cellulaires, effecteurs bactériens intervenant dans la survie intracellulaire, enzymes... Ces facteurs bactériens facilitent la progression de la bactérie dans l'organisme hôte pendant le cheminement vers la niche de réplication.

Enfin, la troisième étape est la sortie de l'hôte et l'entrée dans un autre hôte ou un réservoir¹. Cette étape est un facteur important de succès d'une bactérie pathogène, car elle assure le cycle de la maladie et la perpétuation de l'espèce. Les mécanismes de sortie sont souvent passifs, via l'urine, les matières fécales, les gouttelettes de salive ou les cellules qui desquament (Prescott et al., 2007).

1.2. La réponse de l'hôte

Les mammifères sont constamment confrontés aux microorganismes comme les bactéries, à leurs produits métaboliques et à d'autres virus et molécules provoquant des maladies. C'est pourquoi ils sont équipés d'un système immunitaire, qui s'organise face aux envahisseurs. Celui-ci représente une coordination de molécules, de cellules, de tissus et d'organes capables de discriminer le « soi » du « non soi » et par conséquent, qui permet à ces êtres vivants de se protéger notamment contre les bactéries pathogènes.

Dès les premiers instants de l'interaction avec un pathogène, celui-ci peut être éliminé grâce aux barrières physiques non spécifiques de l'organisme, que sont par exemple la peau,

¹ Le réservoir est le lieu ou l'environnement naturel dans lequel l'agent pathogène est normalement retrouvé, et à partir duquel l'infection de l'hôte peut se produire. Les réservoirs peuvent être animés ou non animés.

les muqueuses, le tractus respiratoire et le tractus intestinal (Janeway and Travers, 1996). Ces barrières représentent la première ligne de défense du corps.

Parfois, l'élimination des bactéries nécessite des mécanismes plus spécifiques, ceux de la réponse immunitaire. Il y a deux types de réponse immunitaire, qui agissent de concert. Tout d'abord, la réponse immunitaire non spécifique ou l'immunité naturelle, que notre corps possède d'emblée. Elle comprend des mécanismes de défenses innés, hérités par tous, et constituant la première ligne de défense. Ce type d'immunité n'a pas de mémoire immunologique, c'est-à-dire que les mécanismes de défense sont identiques à chaque rencontre avec un microorganisme ou un corps étranger. Ensuite, il y a la réponse immunitaire spécifique ou immunité acquise. Ce type d'immunité est spécifique de certains pathogènes, et est mise en place suite à des rencontres avec des microorganismes ou suite à une vaccination. Les différents acteurs de l'immunité sont repris dans le tableau 1 (Janeway and Travers, 1996; Prescott et al., 2007).

Immunité naturelle	Les éléments	Leurs fonctions
Cellules	<ul style="list-style-type: none"> - Monocytes → macrophages - Leucocytes polymorphonucléaires (PMN) neutrophiles - PMN basophiles et PMN éosinophiles - Mastocytes - Cellules Natural Killer (NK) 	<p>Phagocytose et activation des mécanismes antimicrobiens, cellules présentatrices d'antigène</p> <p>Phagocytose et activation des mécanismes antimicrobiens</p> <p>Libération de substances cytotoxiques à proximité de l'intrus et destruction</p> <p>Impliqués dans les réactions allergiques, ils libèrent des granules contenant notamment de l'histamine, ce qui provoque une contraction des muscles lisses, une vasodilatation, l'augmentation de la vasoperméabilité et la sécrétion de mucus.</p> <p>Destruction de cellules infectées ou cancéreuses par libération de médiateurs cytotoxiques ou en causant des dommages à la membrane plasmique</p>
Composants humoraux	- Le complément	Opsonines et lyse des bactéries
Immunité acquise		
Cellules	<ul style="list-style-type: none"> - Lymphocytes (Th, TCD4) - Lymphocytes T cytotoxiques (Tc, TCD8) - Lymphocytes B 	<p>Organisation de la réponse immunitaire spécifique</p> <p>Lyse des cellules infectées</p> <p>Production d'anticorps</p>
Composants humoraux	- Anticorps	Neutralisation, opsonisation, activation du complément

Tableau 1 : Liste non exhaustive des éléments cellulaires et humoraux participant à la réponse immune naturelle, non spécifique, et à la réponse immune acquise, spécifique. Adapté d'après (Janeway and Travers, 1996).

Chaque organisme réagit différemment face à une infection. En effet, le statut immunitaire de l'hôte est l'un des facteurs qui définit l'issue de l'interaction entre les deux protagonistes. Ce statut représente la sensibilité et la résistance de l'hôte, déterminées par des variations génétiques (complexe majeur d'histocompatibilité) et environnementales (stress, co-infection avec un autre pathogène) propres à chacun (Kramnik and Boyartchuk, 2002).

Les cellules phagocytaires (monocytes, macrophages et neutrophiles), acteurs de l'immunité naturelle, constituent une défense précoce importante car elles sont capables de reconnaître, d'ingérer et de détruire des microorganismes par le processus de phagocytose.

Introduction

1. La phagocytose

La phagocytose est un processus qui permet l'internalisation de particules (inertes ou non) et de microorganismes de taille supérieure ou égale à 0,5 μm , par des macrophages, monocytes et PMN neutrophiles (phagocytes professionnels), ou par des cellules épithéliales (phagocytes non professionnels) (Alberts et al., 2002; Rabinovitch, 1995).

Ce processus d'internalisation est initié par la reconnaissance du ligand par les récepteurs de surface qui induisent un signal intracellulaire, puis une réponse. Différents types de récepteurs sont présents en membrane d'un phagocyte, et plusieurs ligands peuvent activer la phagocytose. Parmi eux, on compte, premièrement, des motifs présents à la surface des bactéries tels que les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif (Thomas et al., 2000), les acides téchoïques des bactéries à Gram positif (Dunne et al., 1994), les polysaccharides fongiques et les sulfatides et glycolipides mycobactériens (Ezekowitz et al., 1990). Deuxièmement, des débris cellulaires, des composés spécifiques des cellules apoptotiques mais également des particules inertes telles que des billes de latex peuvent également constituer des ligands qui activent le processus de phagocytose (Kwiatkowska and Sobota, 1999). Les récepteurs, quant à eux, correspondent plus ou moins spécifiquement aux ligands rencontrés, et agissent seuls ou en interaction (Pollard and Earnshaw, 2004). Cette interaction ligand-récepteur déclenche la signalisation intracellulaire qui aboutit à la formation de pseudopodes par déformation de la membrane plasmique cellulaire suite à une réorganisation du cytosquelette d'actine (Alberts et al., 2002). Ensuite, les pseudopodes se rejoignent et la particule se retrouve internalisée dans une vacuole appelée phagosome (figure 1).

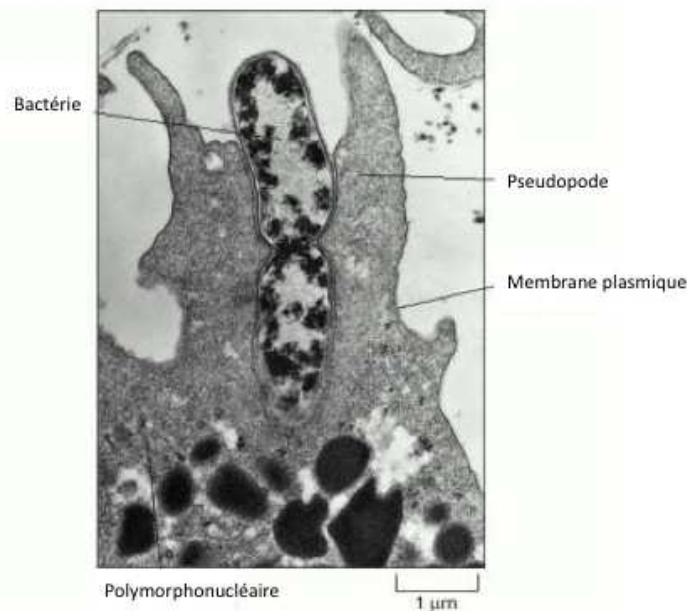


Figure 1 : Micrographie électronique d'un PMN neutrophile phagocytant une bactérie en division (Alberts et al., 2002).

2. La voie phagolysosomale

Après la dépolymérisation des filaments d'actine qui entourent le phagosome, celui-ci migre vers la région péri-nucléaire via le réseau de microtubules (Pollard and Earnshaw,

2004). Au cours de cette migration, le phagosome subit une maturation, permise par une série d'évènements de fusion et de fission avec les compartiments endosomaux et lysosomaux, qui vont permettre l'établissement d'un environnement propice à la dégradation des particules ingérées (Isberg et al., 2009). Cela se traduit par l'acquisition et la perte continues de protéines, ainsi que par une acidification du contenu du phagosome causé par l'enrichissement membranaire de la v-ATPase qui pompe des protons dans la lumière de celui-ci (figure 2) (Pitt et al., 1992; Pollard and Earnshaw, 2004). Les interactions entre le phagosome et les vésicules endosomales seraient très brèves, c'est-à-dire que la fusion partielle permettrait tout juste l'échange de quelques protéines et d'une partie du contenu de ces vésicules. Cette hypothèse a été introduite par Desjardins sous le nom de « kiss and run » (Desjardins, 1995).

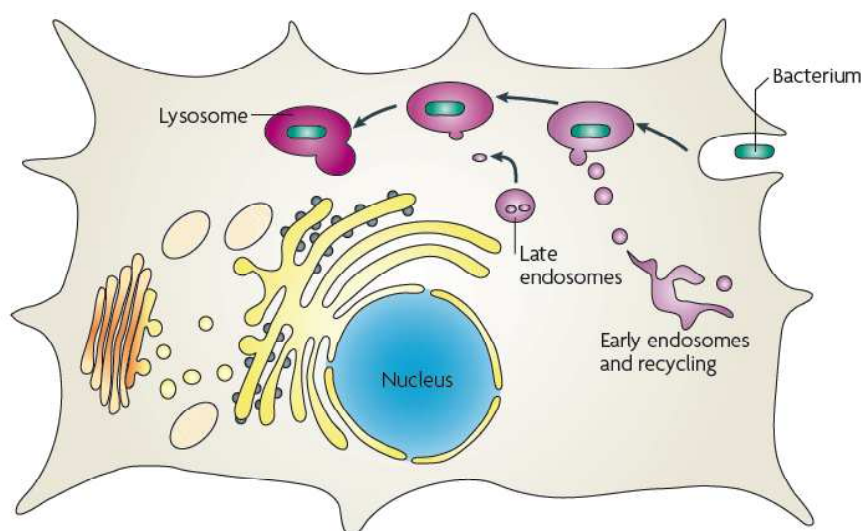


Figure 2 : Schéma d'une cellule internalisant une bactérie (bacterium). La maturation du phagosome (en rouge) exige des interactions successives avec les compartiments précoces (early endosomes and recycling) et tardifs (late endosomes) du réseau endosomal. L'issue de ce processus est la dégradation du contenu phagosomal dans les lysosomes. Le noyau est en bleu (nucleus) (Isberg et al., 2009).

Après endocytose, le phagosome interagit, tout d'abord, avec les endosomes précoces (pH d'environ 6,5), et s'enrichit des marqueurs membranaires caractéristiques de ceux-ci, Rab5² et EEA1³. Ces protéines régulent la fusion des membranes endocytaires (Callaghan et al., 1999; Gorvel et al., 1991; Mu et al., 1995). A partir des compartiments précoces, il y a deux possibilités de tri. La première permet le recyclage en membrane plasmique des protéines ou récepteurs internalisés via un passage par les endosomes de recyclage (pH : 6) , qui portent le marqueur Rab 11 en membrane (Lemmon and Traub, 2000). La deuxième voie implique la redirection du matériel destiné à être dégradé vers les endosomes tardifs. Les endosomes tardifs, difficiles à distinguer des lysosomes, sont des compartiments plus acides que les endosomes de tri (pH : 5,5) et enrichis en enzymes hydrolytiques. Ils peuvent être identifiés par leur morphologie multivésiculaire et par la présence des marqueurs Rab7, Rab9, du récepteur mannose-6-phosphate et des protéines associées à la membrane des lysosomes, les

² Les Rab sont de petites GTPases qui se trouvent sur la face cytoplasmique des endosomes précoces et qui jouent un rôle clé dans le mouvement et le ciblage/ancrage des vésicules de transport avec leurs compartiments accepteurs, ainsi que dans la formation des domaines membranaires (Callaghan et al., 1999).

³ EEA1 (early endosome antigen 1 protein) est une protéine effectrice de Rab5 impliquée dans l'arrimage des vésicules d'endocytose avant la fusion avec les endosomes précoces (Callaghan et al., 1999).

LAMPs⁴ (Mukherjee et al., 1997). L'acquisition de ces marqueurs en membrane du phagosome traduit donc la maturation de celui-ci vers ces compartiments plus tardifs du réseau endo-lysosomal (Vieira et al., 2002). Cependant, les mécanismes par lesquels le matériel endocyté parvient aux endosomes tardifs et aux lysosomes sont encore vagues. Deux modèles prédominants sont proposés : le modèle du transport vésiculaire et le modèle de la maturation. Premièrement, le modèle du transport vésiculaire suggère que les endosomes tardifs et les lysosomes sont des organites stables, par lesquels transitent des vésicules intermédiaires ou corps multivésiculaires transportant du matériel provenant des endosomes précoces. Deuxièmement, le modèle de la maturation propose que les endosomes sont des organites transitoires qui subissent une maturation vers un statut de corps multivésiculaires et ce, par une série d'éléments de fusion et fission encore très peu caractérisés (Gu and Gruenberg, 1999; Thilo et al., 1995).

La dernière étape de maturation est celle qui dirige le phagosome depuis les endosomes tardifs vers les lysosomes. Les lysosomes sont des organelles ubiquitaires et dynamiques dont l'un des nombreux rôles est la dégradation du matériel endocyté (Pollard and Earnshaw, 2004). Deux classes de protéines sont importantes pour assurer la fonctionnalité des lysosomes. La première regroupe les hydrolases lysosomales solubles, ou hydrolases acides, qui sont responsables de l'activité catabolique des lysosomes, alors que la deuxième classe est celle des protéines membranaires lysosomales (Saftig and Klumperman, 2009). Ces dernières présentent diverses fonctions telles que l'acidification de la lumière (V-ATPase) du lysosome, nécessaire à l'activation des hydrolases, l'importation de protéines du cytosol, la fusion membranaire ou encore le transport des produits de dégradation vers le cytoplasme. Les plus abondantes, qui sont également des marqueurs des lysosomes, sont les LAMPs, les LIMP⁵ et CD63 (Kuronita et al., 2002; Saftig and Klumperman, 2009). Dans les lysosomes, l'activité des hydrolases lysosomales conduit à la production de produits de l'hydrolyse qui peuvent diffuser vers le cytoplasme où ils seront réutilisés par la cellule dans des processus de biosynthèse divers.

3. *Brucella* spp.

3.1. Généralités

La brucellose a été décrite pour la première fois sous la forme de « fièvre de Malte » en 1859 sur l'île de Malte, par un médecin anglais nommé Marston. En 1887, Sir David Bruce parvient à isoler le microorganisme responsable de la pathologie à partir de la rate d'un soldat infecté et décédé. Bruce baptise ce microorganisme « *Micrococcus melitensis* », renommé plus tard *Brucella melitensis* en son honneur (Cutler et al., 2005). La brucellose, décrite comme étant l'une des zoonoses bactériennes les plus répandues mondialement, affecte principalement les animaux de rente alors que l'homme ne constitue qu'un hôte occasionnel pour la bactérie (Smith and Ficht, 1990).

⁴ Les protéines LAMP (lysosomes-associated membrane protein) sont des protéines transmembranaires du lysosome comportant un domaine luminal fortement glycosylé et une petite queue cytosolique. Leur rôle reste encore mal connu, mais il semblerait qu'elles interviennent notamment dans la maturation des phagosomes et autophagosomes et dans la localisation périnucléaire des lysosomes (Saftig et al., 2009).

⁵ Les protéines LIMP (lysosome integral membrane protein) sont des protéines transmembranaires du lysosome fortement glycosylées. Leur rôle est également peu connu mais elles semblent impliquées dans la biogenèse des compartiments endolysosomaux (Kuronita et al., 2002).

3.2. Taxonomie

La brucellose est donc une maladie infectieuse causée par les bactéries du genre *Brucella*. Celles-ci sont de petits coccobacilles intracellulaires facultatifs immobiles à Gram négatif, mesurant 0,6 à 1,5 μm de long et 0,5 à 0,7 μm de large (Moreno et al., 1990). Les membranes des bactéries à Gram négatif ont la particularité d'être composées de trois feuillets (figure 3) (Prescott et al., 2007):

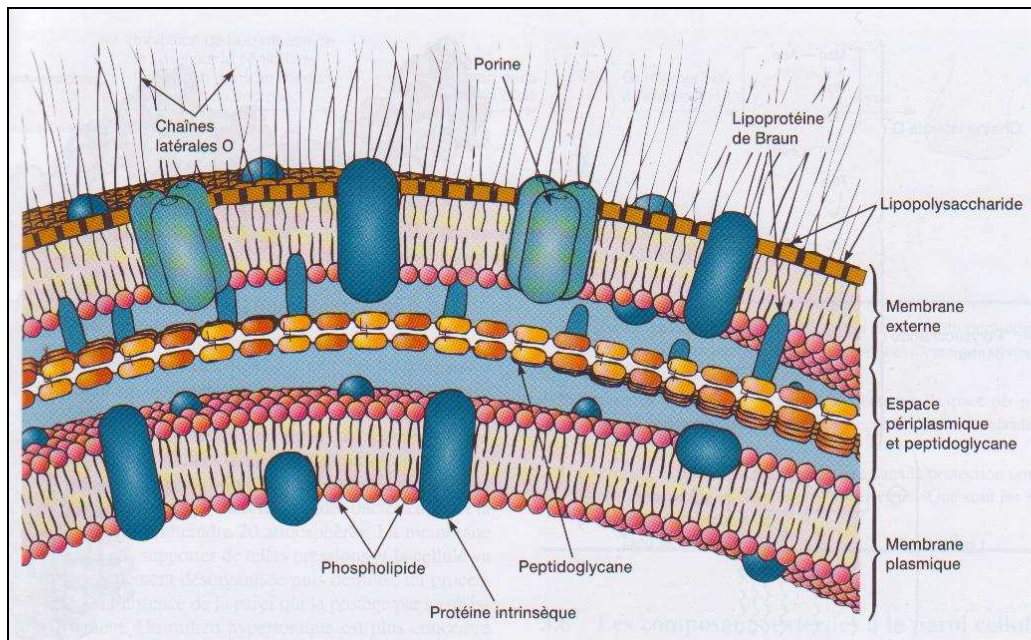


Figure 3 : Illustration de la composition de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif (Prescott et al., 2007)

- **La membrane plasmique**, bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées des protéines.
- **Le périplasma** contenant une couche de peptidoglycane ainsi que des protéines de jonction permettant d'assurer l'intégrité de l'enveloppe bactérienne.
- **La membrane externe**, bicouche lipidique parsemée de protéines (p. ex. des porines). La plus abondante est la lipoprotéine de Braun, elle réalise la jonction entre la membrane externe et le périplasma. La membrane externe est également couverte par les lipopolysaccharides (LPS). Ceux-ci sont formés de trois domaines : la chaîne latérale O qui détermine le phénotype lisse de la bactérie, le core ou oligosaccharide central et le lipide A (figure 4). Le polysaccharide O est un homopolymère non branché de 4,6-dideoxy-4-formamido- α -D-mannopyranosyl liés en 1,2 avec une longueur moyenne de chaîne de 96 à 100 unités glycosyl (Bundle et al., 1989). Ce polysaccharide O est lié à un noyau oligosaccharidique (le core) composé de mannose, de glucose, de 2-amino-2,6-dideoxy-D-glucose (quinovosamine), de 2-amino-2-deoxy-D-glucose (glucosamine) de 3-deoxy-D-manno-2-acide octulosonique (KDO), ainsi que de sucres non identifiés. Enfin, le lipide A contient du 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose (diaminoglucose), relié par les liens amides et esters à une longue chaîne d'acides gras saturée (Moreno et al., 1990). Le lipide A est le constituant majeur du manteau de la membrane externe, il est hydrophobe et est le responsable principal des propriétés endotoxiques attribuées au LPS.

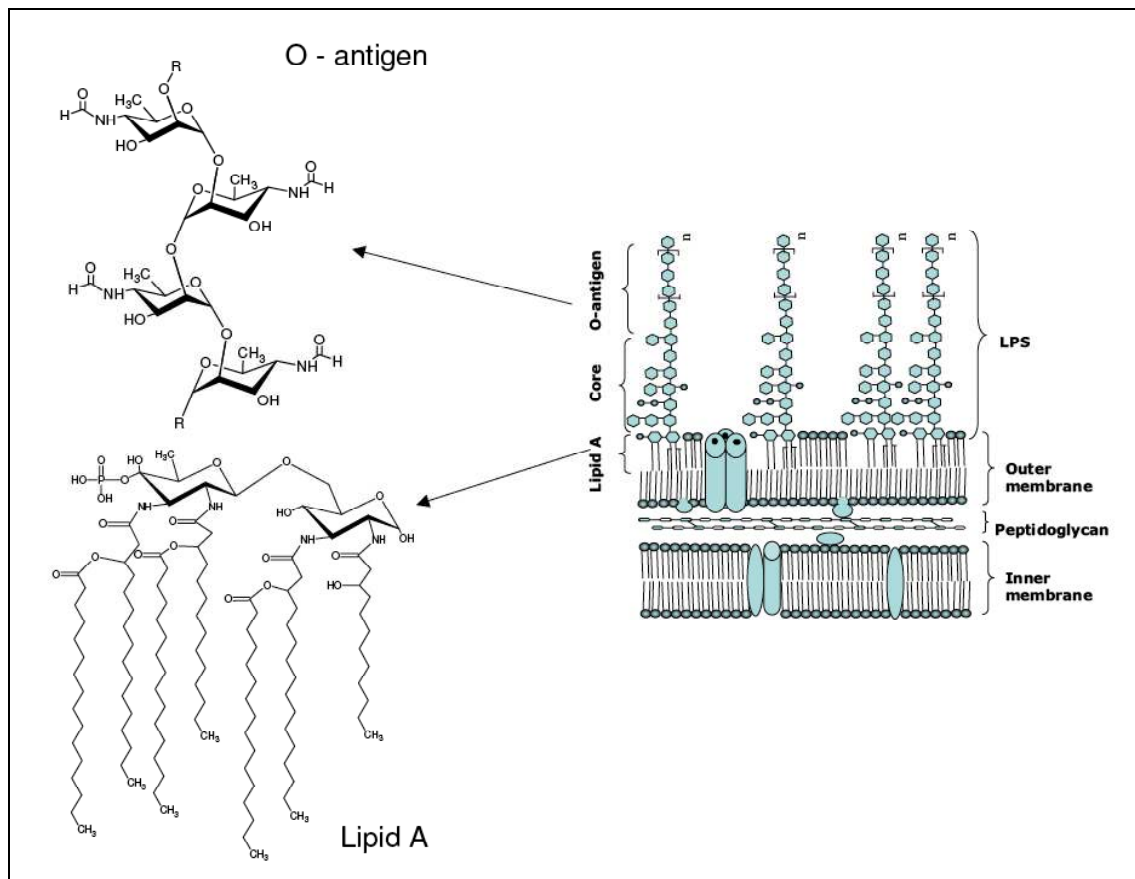


Figure 4 : Structure schématique du LPS de *Brucella* spp.

Au même titre que *Rhizobium* spp., *Agrobacterium* spp. et *Bartonella* spp., *Brucella* spp. appartient à la classe des alpha-2-protéobactéries (Moreno et al., 1990). Cette classe, incluant de nombreux autres pathogènes, regroupe des bactéries capables de réaliser des associations telles que la symbiose ou le parasitisme avec des cellules eucaryotes (Moreno et al., 1990). On dénombre neuf espèces appartenant au genre *Brucella*, classées en fonction de leur gamme d'hôtes et de leur pouvoir pathogène. Voici les six espèces les plus communes : *B. melitensis*, la souche la plus virulente pour l'homme et qui présente un tropisme pour les chèvres et les moutons, *Brucella abortus* pour les bovins, *B. suis* pour les porcins, *B. canis* pour les chiens, *B. ovis* pour les ovins et *B. neotomae* pour les rats du désert (Cutler et al., 2005; Osterman and Moriyon, 2006). Trois autres espèces ont été décrites tout récemment, à savoir *B. microti*, une espèce isolée du campagnol des champs (Scholz et al., 2008) ainsi que les deux espèces de *Brucella* capables d'infecter les mammifères marins, *B. ceti* et *B. pinnipedialis* (Foster et al., 2007).

3.3. La brucellose

Chez l'humain, la brucellose est communément appelée fièvre ondulante. Seulement quatre des neuf espèces de *Brucella* infectent l'homme, à savoir *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* et *B. canis*. On sait que l'apparition d'un cas humain est presque toujours précédée par un contact direct ou indirect avec des animaux infectés (Godfroid et al., 2005). L'infection se déclenche généralement après ingestion de nourriture contaminée (lait non pasteurisé ou produits laitiers provenant d'animaux infectés), par contact avec une lésion cutanée ou par inhalation d'aérosols infectieux (Gorvel et al., 2009). Rares sont les cas connus de

transmission d'homme à homme. La brucellose humaine est initialement asymptomatique et se déroule généralement en 3 phases (Corbel, 2006) :

- Primo-invasion aiguë : Cette phase survient après 1 à 3 semaines d'incubation. On constate une fièvre ondulante sudoro-algique (fièvre ondulante, sueurs abondantes, arthralgies, myalgies, fatigue, sensations de malaise).
- Phase secondaire : Constitution de foyers infectieux isolés ou multiples causant des affections ostéoarticulaires, neurologiques, hépatiques, génitales ou cardiaques (mortels dans 80 % des cas).
- Phase chronique : Elle survient parfois après les deux premières phases, mais elle peut être aussi inaugurale. Les manifestations sont une fatigue persistante avec troubles du caractère, douleurs musculaires, névralgies, douleurs ostéo-articulaires, sueur au moindre effort et fébricule (petite fièvre). On parle de « patraquerie brucellienne ».

En cas d'infection par *Brucella*, il est important de mettre rapidement en place un traitement afin d'éviter l'installation de la chronicité de la maladie. En effet, à ce stade, une majorité des bactéries se trouve à l'intérieur des cellules, elles sont donc moins accessibles aux médicaments. Une antibiothérapie quotidienne de type Rifampicine 600 mg / Doxycycline 200 mg est recommandée par l'OMS pour traiter la brucellose. La durée de traitement, en général 5 semaines, est cependant adaptée en fonction du stade de la maladie (Corbel, 2006).

Chez les animaux, les manifestations de la brucellose sont l'avortement chez les femelles gestantes, causé par la présence de bactéries au niveau du placenta, alors que la stérilité est observée chez les mâles infectés. Le caractère chronique de la maladie complique fortement les mesures d'éradication et, l'aptitude des bactéries à subsister quelques mois dans le sol, l'eau, le purin, facilite l'expansion de la maladie à l'échelle de cheptels entiers, causant d'importantes pertes économiques, en particulier dans les pays en voie de développement (Corbel, 2006).

Seulement 10 à 100 bactéries de *B. melitensis* suffisent à infecter l'hôte. *Brucella* est considérée comme un agent potentiel de bioterrorisme et est cataloguée pathogène de classe 3⁶ (Pappas et al., 2006). Par conséquent, des précautions sont de mise lors de la manipulation de *Brucella* en laboratoire comme l'installation d'un laboratoire BSL3 (Biosafety Level 3), adapté à ce type de pathogène, ainsi que la formation et le contrôle médical régulier des expérimentateurs (Pappas et al., 2006).

3.4. Pathogénie

Brucella pénètre l'organisme par les muqueuses des voies cutanées, respiratoires et les muqueuses digestives supérieures (avant l'oropharynx) (Gorvel et al., 2009). Elles se propagent ensuite dans l'organisme par voie lymphatique après avoir rejoint le premier relais ganglionnaire. Les macrophages et les phagocytes non professionnels, qui constituent les cibles principales de *Brucella*, les internalisent alors rapidement (Gorvel and Moreno, 2002). Étant décrits comme des pathogènes extracellulaires et intracellulaires facultatifs, les *Brucella* ont la capacité de survivre pendant de longues périodes aussi bien dans l'environnement que

⁶ Classification des pathogènes - classe 3 : comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs ; leur propagation dans la collectivité est possible, mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace (<http://www.cnrs.fr/>).

dans les cellules de l'hôte, ce qui est déterminant du caractère chronique de la brucellose qu'elles provoquent (Roop et al., 2004).

3.5. Les facteurs de virulence

En comparaison avec d'autres bactéries pathogènes, aucun facteur de virulence classique (exotoxines, fimbriae, capsules, variations antigéniques, facteurs pro-apoptotiques,...) n'a été identifié chez *Brucella* (Moreno and Moriyon, 2001). Pourtant, la capacité de *Brucella* à envahir les cellules et à s'y répliquer a été attribuée aux facteurs de virulence décrits ci-dessous.

Le premier facteur de virulence de *Brucella* est son LPS, qui est le composant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il lui confère une résistance aux attaques microbiennes et intervient dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Cardoso et al., 2006). Comme cité plus haut, le LPS est composé de trois domaines, à savoir le lipide A, le core et la chaîne O (figure 4). La présence de la chaîne O détermine le phénotype lisse de la souche, et son absence, le phénotype rugueux. En 2003, il a été démontré que la présence de cette chaîne O est importante pour l'infection par *Brucella*, ainsi que pour sa survie intracellulaire (Porte et al., 2003). En effet, la pénétration des souches lisses dans la cellule se fait via des microdomaines spécialisés que sont les radeaux lipidiques, contrairement aux souches rugueuses, dont l'entrée n'est pas médiée par ces microdomaines membranaires. La fusion rapide avec les lysosomes est l'issue des souches rugueuses (Porte et al., 2003).

Le deuxième facteur de virulence chez *Brucella* est le système à deux composants BvrR/BvrS, qui contrôle l'expression d'au moins deux protéines de membrane externe, à savoir Omp3a et Omp3b, ainsi que la composition du lipide A du LPS (Manterola et al., 2007; Manterola et al., 2005). Bien qu'il ait été démontré que la virulence n'est pas liée à la modification de l'expression d'Omp3a et Omp3b (Manterola et al., 2007), les souches mutées pour ce système perdent leur virulence lorsqu'elles sont inoculées à des souris, et présentent une diminution de la capacité d'invasion et de réplication en phagocytes professionnels et non professionnels. Il est tout à fait possible que d'autres protéines de membrane externe soient affectées chez la souche mutée pour BvrR/BvrS (Manterola et al., 2007).

Enfin, l'opéron *virB* encode le système de sécrétion de type IV de *Brucella*, assure également la virulence de cette bactérie. Ce type de machinerie est dédié à la sécrétion de protéines ou « effecteurs » importants dans le processus d'infection, comme c'est le cas chez d'autres bactéries pathogènes telles que *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori* et *Legionella pneumophila* (Christie, 2001). Chez *Brucella*, le système VirB est impliqué dans le trafic intracellulaire de la bactérie et plus précisément dans le contrôle de la maturation de la vacuole bactérienne jusqu'à l'établissement de la niche de réplication (Celli et al., 2003). En effet, lorsque ce système est muté, *Brucella* est incapable d'établir sa niche répllicative et est finalement détruite dans les lysosomes (Celli et al., 2003). Cependant, les potentiels effecteurs sécrétés via la machinerie VirB et capables d'exercer cette modulation du trafic dans la cellule hôte restent encore inconnus.

3.6. Le trafic intracellulaire de *Brucella*

La survie intracellulaire est assurée par la capacité de *Brucella* à contrecarrer les mécanismes de défense de la cellule. Premièrement, la bactérie parvient à échapper à l'activation du système immunitaire inné au début de l'infection, en ne déclenchant qu'une réponse inflammatoire minime (Barquero-Calvo et al., 2007). Cette caractéristique est

conférée par le LPS de *Brucella* qui, d'une part, n'est reconnu par les récepteurs TLR4⁷, présents en surface de certaines cellules immunitaires, qu'à de fortes concentrations. D'autre part, ce LPS est résistant aux peptides bactéricides cationiques émis par les neutrophiles et enfin, il est un faible activateur du complément (Barquero-Calvo et al., 2007). Deuxièmement, *Brucella* parvient à moduler le trafic intracellulaire classique menant aux lysosomes, dans le but d'atteindre sa niche de réplication propice à la multiplication bactérienne (Celli, 2006; Pizarro-Cerda et al., 1998; Starr et al., 2008) (figure 5). En effet, après internalisation, la vacuole contenant les *Brucella* interagit successivement avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et brièvement avec les lysosomes. A ce stade, cette vacuole bactérienne est capable d'interagir avec des sites ERES (endoplasmic reticulum exit sites) du réticulum endoplasmique dans lequel les *Brucella* installent leur niche répliative (Starr et al., 2008). Malheureusement, les mécanismes moléculaires impliqués dans le trafic de *Brucella* sont encore très mal connus à ce jour.

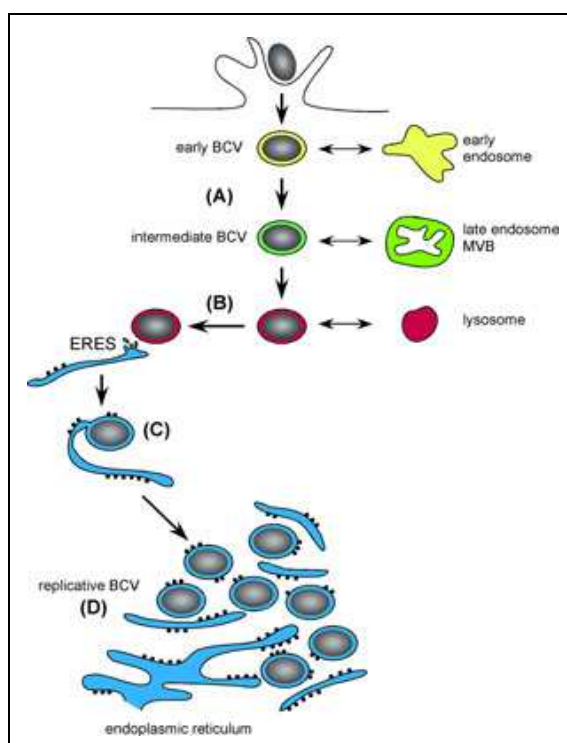


Figure 5 : Trafic intracellulaire de *Brucella*. Après internalisation des bactéries, la BCV (*Brucella* containing vacuole) qui les contient interagit successivement avec les endosomes précoces (early endosomes) et endosomes tardifs (late endosomes) avant de rencontrer les lysosomes. Il a été démontré que cette suite d'interactions est essentielle pour la maturation du BCV et la formation de la niche de réplication bactérienne (replicative BCV) dérivée du réticulum endoplasmique (endoplasmic reticulum), le brucellosome (Starr et al., 2008).

3.6.1. Adhésion et internalisation

Les premières étapes de l'infection par *Brucella* consistent en l'adhésion et l'entrée des bactéries dans les cellules cibles. Cependant, aucune adhésine n'a été identifiée chez *Brucella*

⁷ TLR4 : les toll-like receptors de type 4 sont des récepteurs membranaires désignés par le terme de PRRs (Pattern Recognition Receptors) associés à au récepteur protéique de surface CD14. Les LPS sont détectés par la protéine cytoplasmique LBP (LPS binding protein) qui s'associe aux CD14. Ce complexe est reconnu par les TLR4, qui initie une voie de signalisation conduisant à l'activation de médiateurs inflammatoires qui modulent la réponse immunitaire.

spp. La manière dont *Brucella* pénètre dans le milieu intracellulaire diffère si la cellule est un macrophage ou un phagocyte non professionnel (Gorvel and Moreno, 2002).

La porte d'entrée des *Brucella* à phénotype lisse dans les macrophages, en absence d'opsonisation, se fait au niveau des radeaux lipidiques, riches en cholestérol et en ganglioside GM1. En effet, après que les composants majeurs des radeaux lipidiques aient été complexés ou affectés négativement, l'entrée de *B. suis* en macrophage (J774.A1) s'est révélée altérée (Naroeni and Porte, 2002).

Aussi, la chaîne O du LPS de *Brucella* spp. semble jouer un rôle dans l'entrée médiée par les radeaux lipidiques, mais aussi dans le retard de fusion de la vacuole bactérienne avec les lysosomes. C'est pourquoi les souches rugueuses, dépourvues de chaîne O, sont rapidement dégradées par les lysosomes (Porte et al., 2003). Cependant, les mécanismes moléculaires qui régissent ce processus ne sont pas encore connus.

D'autre part, la liaison et l'entrée de *B. abortus* dans les cellules épithéliales fait intervenir le cytosquelette, car l'internalisation est affectée lorsque les cellules sont traitées avec des inhibiteurs de l'actine, de la myosine et des microtubules (Guzman-Verri et al., 2001). De plus, la surexpression des petites GTPases Rho, Rac et Cdc42, en cellules HeLa stimule la liaison et l'internalisation de *B. abortus* (Guzman-Verri et al., 2001), ce qui amène des arguments supplémentaires quant à la capacité de *Brucella* de moduler le cytosquelette de la cellule hôte pour y pénétrer.

3.6.2. *Brucella* tout au long de la voie endocytaire

Une fois internalisée, *Brucella* réside dans un compartiment de type phagosomal appelé la BCV (*Brucella* containing vacuole) qui réalise des interactions avec les endosomes précoces (Pizarro-Cerda et al., 1998). La colocalisation avec les marqueurs d'endosomes précoces EEA1 et Rab5 est détectable endéans les 10 minutes après inoculation de cellules HeLa par *B. abortus*, et disparaît après 30 minutes. Par conséquent, l'interaction entre la BCV et les endosomes précoces est qualifiée de transitoire (Pizarro-Cerda et al., 1998). Ensuite, la BCV acquiert quelques marqueurs des endosomes tardifs et des lysosomes tels que LAMP-1, CD63, Rab7 et son effecteur RILP et ce, jusqu'à 12h après l'infection, aussi bien en phagocytes professionnels que non professionnels. Cette interaction de la BCV avec les lysosomes a été récemment mise en évidence, et le fait que *Brucella* puisse résister à cette fusion lysosomale semble assez surprenant au vu des conditions hostiles rencontrées dans ce compartiment (Starr et al., 2008). En outre, on sait que l'acidification de la BCV causée par la fusion avec les lysosomes est absolument requise pour assurer sa maturation. Celle-ci mène à la perte progressive des marqueurs d'endosomes tardifs/lysosomes en membrane de la BCV puis, des interactions au niveau des ERES (endoplasmic reticulum exit sites) surviennent avant la formation d'un organelle répliatif dérivé du RE, le brucellosome (Starr et al., 2008) (figure 5). En effet, la protéine Sec61 β , marqueur du RE, est en membrane de la majorité (70-75%) des BCV de *B. abortus* 2308 et de *B. abortus* S19 2h après inoculation de cellules HeLa (Pizarro-Cerda et al., 1998).

Cependant, quels sont les mécanismes permettant aux bactéries de dévier le trafic intracellulaire classique pour établir la niche répliative?

On connaît déjà le rôle crucial que joue le système de sécrétion de type IV Vir B dans l'établissement de la niche répliative de *Brucella* (« Introduction » chap. 3.5.) (Celli et al., 2003)

Aussi, les chercheurs portent depuis peu de temps, un intérêt croissant à un autre mécanisme de sécrétion : la production de vésicules de membrane externe. Celles-ci sont

produites par les bactéries à Gram négatif, et sont importantes dans les interactions entre bactéries et cellules eucaryotes. En effet, elles sont décrites comme de réels « communicasomes », favorisant la survie et la réplication des bactéries dans leur environnement (Lee et al., 2008), en permettant la sécrétion de composants bactériens qui pourraient être enrichis dans ces vésicules (Kuehn and Kesty, 2005). Depuis 1987, on sait que *Brucella* spp. produit des fragments membranaires (Gamazo and Moriyon, 1987), mais aucune caractérisation détaillée de ceux-ci n'a été réalisée jusqu'à présent. Un éventuel rôle de ce matériel bactérien dans le trafic intracellulaire de *Brucella* pourrait donc être une hypothèse très intéressante, et pourquoi pas, amener de nouveaux éléments qui permettraient de mieux comprendre les mécanismes mis en place par *Brucella* durant l'infection.

4. Les vésicules de membrane externe

4.1. Généralités

La découverte des vésicules de membrane externe, ou OMVs (outer membrane vesicles), remonte aux années 1960, lors de l'observation de bactéries en microscopie électronique. Des petites excroissances de la membrane bactérienne ont été observées, et ont été dénommées « blebs » ou « éléments membranaires » (Bayer and Anderson, 1965; Bladen and Waters, 1963). Plus tard, il s'est avéré que ces vésicules sécrétoires émanent, de manière constante en conditions normales de culture, de la paroi des bactéries à Gram négatif (Ingram et al., 1973; Lindsay et al., 1973). En effet, l'observation de ces mêmes vésicules au niveau des parois de beaucoup d'autres souches bactériennes du même type, notamment *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhimurium* souligne que pratiquement toutes les bactéries à Gram négatif produisent des OMVs (Bayer and Anderson, 1965; Beveridge, 1999; Devoe and Gilchrist, 1973).

Plus concrètement, les vésicules de membrane externe sont des petites sphères munies d'une simple membrane, qui mesurent de 50 à 250 nm de diamètre (en fonction de l'espèce bactérienne). Cette production a lieu aussi bien en culture liquide et solide in vitro (Fernandez-Moreira et al., 2006), qu'in vivo (Necchi et al., 2007) ou encore au sein de biofilms (Schooling and Beveridge, 2006).

Produites par bourgeonnement de la membrane externe de la bactérie, les vésicules emportent avec elles des constituants membranaires et périplasmiques comme des protéines, des LPS et des phospholipides (Kuehn and Kesty, 2005), mais aussi de l'ADN, du peptidoglycan et des protéines cytoplasmiques (Lee et al., 2007) (figure 6). Un enrichissement et/ou une exclusion spécifique(s) de certains de ces composants, en comparaison avec le contenu des bactéries intactes, assignent un rôle sécrétoire aux OMVs (Kuehn and Kesty, 2005).

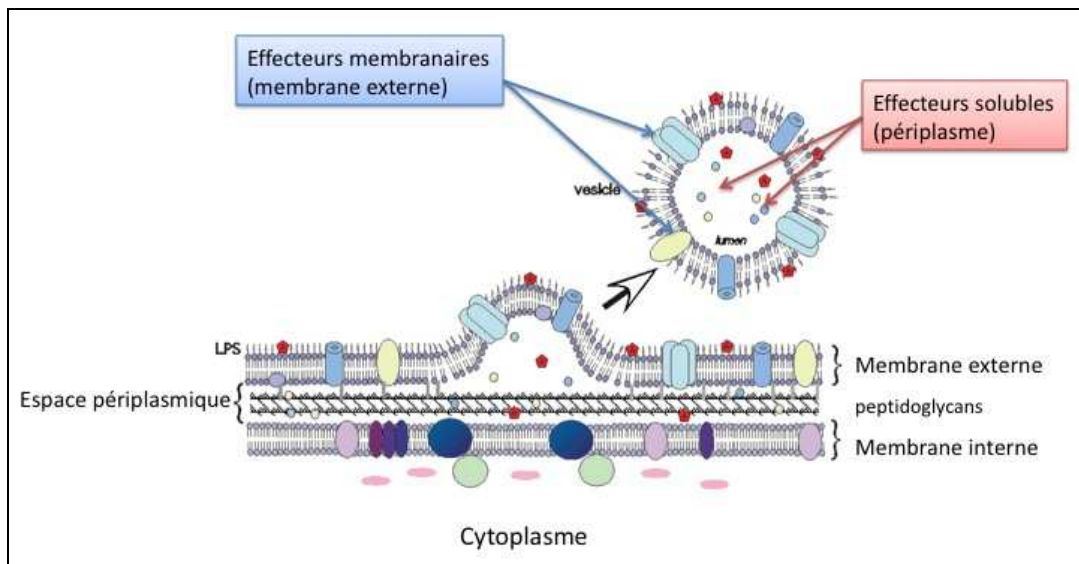


Figure 6 : Représentation du bourgeonnement de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, donnant naissance aux vésicules de membrane externe (OMVs) (Kuehn and Kesty, 2005).

4.2. Biogenèse des vésicules

Tout dernièrement, l'équipe de Deatherage a proposé un modèle décrivant la biogenèse des OMVs de *Salmonella*, qui suggère que les vésicules sont produites lors de la croissance et de la division bactérienne (Deatherage et al., 2009) (figure 7). Chez la souche sauvage de *Salmonella*, des protéines d'enveloppe assurent les connections entre les trois feuillets de l'enveloppe. Durant la phase de croissance bactérienne, des remodelages localisés de l'enveloppe favorisent l'apparition de régions membranaires possédant moins de connections entre la membrane externe et la couche de peptidoglycan, ce qui aboutit au relargage de petites vésicules de membrane externe. Aussi, durant le processus régulé de division cellulaire, l'invagination de la membrane bactérienne au niveau du septum engendre des perturbations de l'intégrité des connections entre les trois feuillets. Par conséquent, la membrane externe qui n'est plus rattachée au reste de l'enveloppe a la capacité de bourgeonner et de donner naissance à des vésicules de membrane externe (Deatherage et al., 2009).

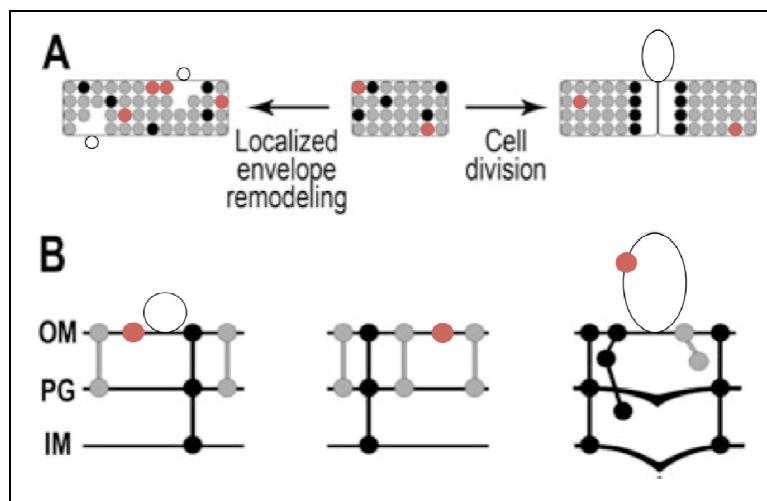


Figure 7 : Modèle de la biogenèse des OMVs. (A) Représentation de la surface de la bactérie. (B) Représentation de l'enveloppe bactérienne. Les protéines de membrane externe sont représentées en rouge, les protéines qui assurent la connection entre la membrane externe et le peptidoglycan sont en gris clair et les protéines qui maintiennent l'intégrité des trois feuillet de l'enveloppe bactérienne sont représentées en noir. A gauche : des remodelages localisés de l'enveloppe induisent le bourgeonnement de petites vésicules de membrane externe aux endroits où il y a moins de connections entre la membrane externe et le périplasme. A droite : Une invagination de la membrane interne et du périplasme au niveau du septum durant la division cellulaire a lieu. Ce phénomène provoque l'apparition de régions dépourvues en connections entre ces trois feuillet de l'enveloppe et par conséquent, la libération de vésicules de membrane externe (Deatherage et al., 2009).

4.3. Rôles des OMVs

On sait à présent que les vésicules de membrane externe ont un rôle majeur dans les interactions entre bactéries d'une communauté microbienne hétérogène, mais aussi dans les interactions entre bactéries et cellules eucaryotes (Mashburn-Warren and Whiteley, 2006). Par conséquent, beaucoup de fonctions sont attribuées aux OMVs, qu'elles soient hypothétiques ou confirmées (Lee et al., 2008; Mashburn-Warren and Whiteley, 2006) (Figure 8). Elles sont notamment suspectées de jouer un rôle dans l'établissement de symbioses telles que celles observées entre les légumineuses et *Rhizobium* spp. En effet, les OMVs favoriseraient la communication entre les deux partenaires, communication qui est requise pour la formation des nodules (Mashburn-Warren and Whiteley, 2006). De plus, beaucoup de bactéries pathogènes, parmi lesquelles *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, produisent des OMVs associées à des toxines qui sont délivrées à des cellules eucaryotes cibles, dans le but de favoriser la survie des bactéries (Kuehn and Kesty, 2005). Les OMVs sont également un moyen pour les bactéries d'entrer en compétition avec les autres espèces présentes dans une communauté microbienne hétérogène ou au contraire, un moyen de réaliser des échanges de matériel génétique par transfert horizontal (Mashburn-Warren and Whiteley, 2006). Et enfin, les OMVs produits par *Legionella pneumophila* (forme transmissible) ont la capacité d'inhiber la fusion entre les phagosomes et les lysosomes dans des macrophages murins (Fernandez-Moreira et al., 2006). De cette manière, la bactérie échappe à sa propre destruction par les lysosomes, et peut aisément établir sa niche de réplication associée au réticulum endoplasmique.

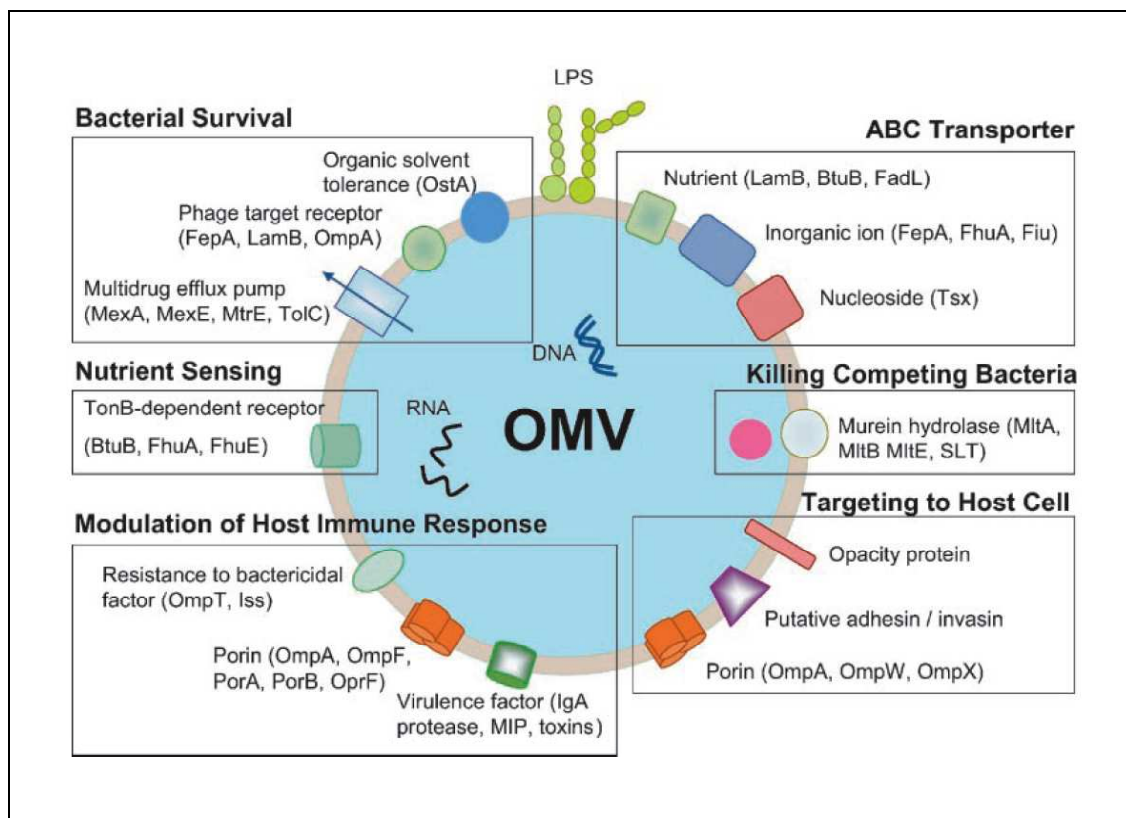


Figure 8 : Représentations des fonctions physiologiques et pathologiques des OMVs produites par les bactéries à Gram négatif. Ce schéma a été réalisé sur base d'études protéomiques des OMVs dérivées de bactéries pathogènes ou non (Lee et al., 2008).

4.4. Trafic intracellulaire des OMVs

Aucune information n'était jusque là disponible au sujet du devenir des OMVs dans les cellules jusqu'à ce qu'une équipe de chercheurs d'Osaka se penche sur les mécanismes d'interactions entre la bactérie *Porphyromonas gingivalis*⁸ et des cellules épithéliales humaines (des cellules HeLa ainsi que des cellules issues d'épithélium gingival humain, les IHGE) (Furuta et al., 2009). Leur étude montre que les OMVs produites par *P. gingivalis*, une fois mises en contact avec les cellules, y adhèrent très rapidement avant d'être endocytées via les radeaux lipidiques. Ensuite, les OMVs sont dirigées vers des compartiments de type endosomes précoces (EEA1), puis vers les compartiments lysosomaux endéans les 90 minutes et y persistent pendant plus de 24h au lieu d'être dégradées rapidement. Cette étude montre donc que les OMVs de *P. gingivalis* sont capables de rentrer efficacement dans les cellules HeLa et IHGE, et d'y rester visiblement intactes pendant une longue période en résistant à l'extrême hostilité des compartiments acides que sont les endosomes tardifs et les lysosomes. Connaissant le caractère chronique et destructeur des pathologies provoquées par *P. gingivalis*, ces résultats font des OMVs une éventuelle cible pour améliorer les traitements de ce type de pathologies.

4.5. *Brucella* et les OMVs

Depuis 1987, on sait que *Brucella* spp. produit des fragments membranaires, mais aucune caractérisation détaillée de ceux-ci n'a été réalisée jusqu'à présent (Gamazo and Moriyon,

⁸ *P. gingivalis* est l'une des bactéries responsable de parodontite qui est une infection des tissus de soutien de la dent. Les protéases sécrétées par la bactérie peuvent amener à une destruction des tissus.

1987). Par conséquent, une étude approfondie des OMVs produites par *Brucella* permettrait d'améliorer la connaissance des mécanismes établis par ces bactéries pour infecter les cellules eucaryotes. En effet, la communauté scientifique dispose d'encore peu d'informations au sujet de la composition et des fonctions physiologiques des OMVs produits par *Brucella*. Actuellement, on sait que les fragments membranaires de *Brucella* ne sont pas seulement produits in vitro, mais également ex vivo, à l'intérieur des cellules infectées par le pathogène. Dès lors, il semblerait que ces composants pourraient avoir un rôle physiologique dans l'établissement de l'infection par *Brucella* et donc dans sa virulence. En ce qui concerne la caractérisation même de ce matériel bactérien, des études protéomiques ont apporté des informations quant à la composition des OMVs produits par *Brucella* : ils sont majoritairement composés de LPS, de phosphatidylcholine (phospholipide majeur de la membrane des *Brucella*), de protéines de membrane externe, et plus particulièrement les Omps du groupe 3 mais aussi de protéines du périplasme (Lamontagne et al., 2007).

Objectifs du mémoire

Brucella spp. est une bactérie intracellulaire facultative qui infecte les phagocytes. Afin d'atteindre sa niche de réplication associée au réticulum endoplasmique, *Brucella* est capable de moduler le trafic intracellulaire classique aboutissant à la dégradation du contenu du phagosome dans les lysosomes. Les mécanismes qui régissent cette perturbation du trafic sont encore très peu connus. D'une part, on sait que le système de sécrétion de type IV de *Brucella* est impliqué dans l'établissement du brucellosome. Il se pourrait que des effecteurs bactériens impliqués dans la maturation de la BVC soient sécrétés via ce système. D'autre part, la production d'OMVs par *Brucella* pourrait également être un moyen de sécréter des composants bactériens impliqués dans cette maturation. La communauté scientifique connaît le phénomène de production de « fragments membranaire » chez *Brucella* depuis 1987 (Gamazo and Moriyon, 1987), mais aucune caractérisation approfondie de ce matériel n'a été réalisée jusqu'à présent.

L'objectif de ce mémoire est, tout d'abord, de mettre en évidence la production d'OMVs par *Brucella*, nous allons donc tenter de développer un protocole de purification des OMVs de *Brucella abortus* 2308.

Dans un deuxième temps, après une caractérisation initiale de la composition des OMVs, nous allons essayer de mieux connaître le devenir des OMVs dans la cellule, après endocytose, et dans ce but, tenter d'établir un profil de distribution intracellulaire des OMVs de *B. abortus* 2308 au cours du temps, en utilisant la technique du fractionnement cellulaire.

Enfin, l'investigation du potentiel impact des OMVs de *B. abortus* 2308 sur le trafic intracellulaire de particules inertes sera abordée. La première étape du trafic étant la phagocytose, nous allons commencer par l'étude de la capacité phagocytaire de macrophages en présence et en absence d'OMVs, afin de détecter une éventuelle influence de celles-ci. L'étude de l'interaction des OMVs sur le trafic phagolysosomal de particules inertes sera ensuite envisagée. En 2006, une équipe américaine a, en effet, démontré un rôle des OMVs produites par *Legionella pneumophila* dans le trafic intracellulaire de la bactérie (Fernandez-Moreira et al., 2006). Celles-ci ont la capacité d'inhiber la fusion entre le phagosome, contenant *Legionella*, et les lysosomes. Nous posons l'hypothèse que les OMVs de *Brucella* pourraient avoir également un rôle dans le trafic intracellulaire de la bactérie, à d'autres étapes de celui-ci.

Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

Les cellules Raw 264,7 sont des macrophages, dérivés de souris BALB/c, transformés par le virus de la leucémie d'Abelson. Les cellules sont cultivées en flacons de 75 cm² à 37°C dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen), contenant 4,5g/l de glucose (DHG), 1,5 g/l de NaHCO₃ et 10% de sérum bovin foetal décomplémenté (FBS). Le passage des cellules se fait en les raclant à l'aide d'un « cell scraper ». Les cellules sont ensuite diluées 10 fois dans du milieu frais.

2. Dosage de protéines

Le dosage protéique « Pierce 660 nm protein assay » est basé sur la liaison entre un complexe métal-sonde et les protéines. En condition acide, cette liaison est permise, ce qui engendre une modification du pic maximal d'absorption de la sonde, qui est mesuré à 660nm. Le complexe métal-sonde a une couleur brune et, lorsqu'il se lie aux protéines, la coloration devient progressivement verte. Cette modification de la couleur est engendrée par la déprotonation de la sonde lors de la diminution du pH, causée par les interactions avec les acides aminés chargés positivement présents dans les protéines. La sonde interagit, en effet, principalement avec les résidus basiques des protéines, tels que l'histidine, l'arginine et la lysine.

20µl (volume final) d'échantillon et de standards (BSA : 0,1 ; 0,2 ; 0,5 et 1µg) sont incubés en présence de 150µl de Pierce 660nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific) dans une plaque 96 puits. Après une incubation de 5 minutes, le mélange est stable et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer, BIO-RAD).

3. Purification des OMVs de *Brucella abortus* 2308

Les vésicules de membrane externe (OMVs) de *Brucella abortus* 2308 sont obtenues de deux manières. D'une part, ce matériel est purifié à partir de cultures au laboratoire BSL3 des FUNDP et d'autre part, des aliquots lyophilisés nous sont envoyés du laboratoire du Pr. Ignacio Moriyon (University of Navarra, Pamplona, Spain). Les protocoles de purification diffèrent.

3.1. Notre protocole

Une préculture de *Brucella abortus* 2308 est réalisée sur 2YT agar (16g/l peptone ; extraits de levure 10g/l ; NaCl 5g/l ; agar 13g/l) bien sec à 37°C durant 3 jours. Les bactéries sont ensuite cultivées en milieu 2YT liquide (16g/l peptone ; extraits de levure 10g/l ; NaCl 5g/l) sous agitation. Puis, la culture est transférée en milieu défini à une densité optique (DO_{600nm}) d'environ 0,1. Le jour suivant, les cultures (DO_{600nm} : 1,1) sont réparties dans 4 erlenmeyers de 2l remplis chacun à 1/5 de leur capacité avec du milieu défini (4 X 400ml en tout) mis au point au laboratoire de biologie moléculaire (FUNDP) et dont la composition fait l'objet d'un accord de confidentialité, afin de permettre une bonne oxygénation des bactéries. Le tout est incubé à 37°C sous agitation. Le lendemain, les cultures ont atteint une DO_{600nm} de plus ou moins 0,950 et sont centrifugées 25 minutes à 3500 rpm (2.500g) pour séparer

grossièrement les bactéries du surnageant. Le surnageant, contenant les OMVs, est filtré grâce à un filtre 0,22 μm , puis le filtrat est concentré 500 fois par la technique de concentration tangentielle sur Amicons retenant les espèces supérieures à 100-KDa (Millipore). Le rétentat (environ 100 μg de protéines dans 1,5 ml) est ensuite mélangé à 1,5 ml d'Optiprep 50% (Sigma Aldrich) et le tout est déposé dans un tube d'ultracentrifugation (Beckman Ultra Clear Centrifuge Tube). Un gradient discontinu de densité d'Optiprep/Hepes est réalisé (2 ml 45%, 2 ml 40%, 2 ml 35%, 1 ml 30%) puis centrifugé 16h à 100.000 g (Beckman rotor SW41). Après cette étape, le gradient est coupé en 8 fractions identiques, et les fractions 1 à 6 sont récupérées. Celles-ci sont diluées dans du PBS puis ultracentrifugées 35 minutes à 150 000 g (Beckman rotor type 70Ti). Le culot, enrichi en OMVs, est resuspendu dans 200 μl de PBS (NaCl 137 mM; KCl 3 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM; KH_2PO_4 1,5 mM) et filtré à travers un filtre 0,22 μm stérilisateur (figure 9).

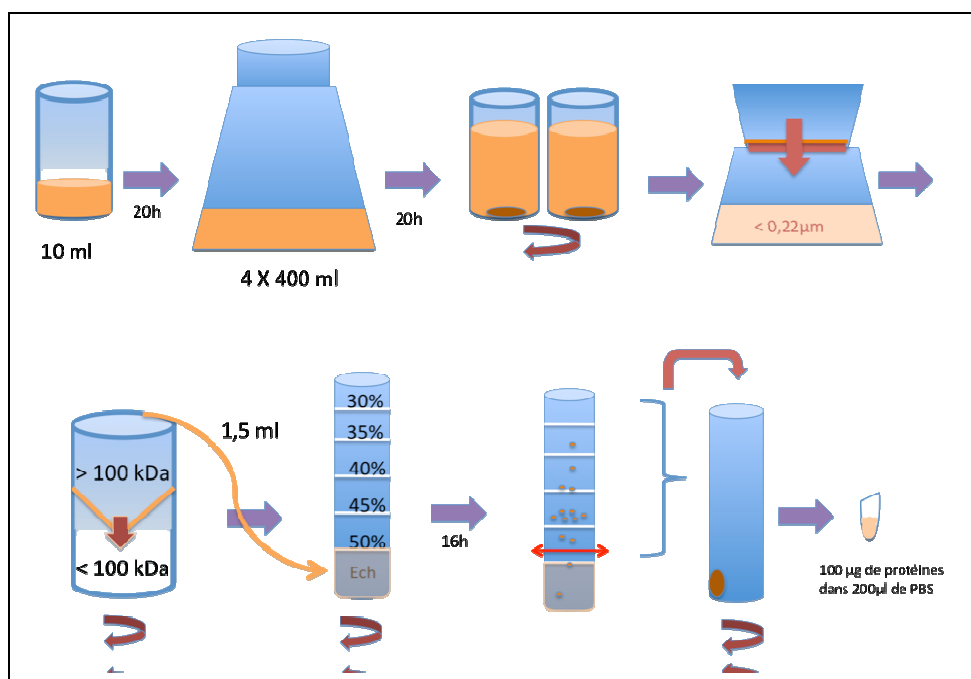


Figure 9 : Illustration du protocole de purification des OMVs

3.2. Protocole du laboratoire du Pr. I. Moriyon (Plamplona, Espagne)

Brucella abortus 2308 est cultivée en fermenteur jusqu'à la phase stationnaire. Les bactéries sont ensuite inactivées durant 48h au phénol 0,5% et centrifugées. Le surnageant est alors concentré par un flux tangentiel (100-KDa cut-off). Puis, le rétentat est à nouveau centrifugé afin d'éliminer les débris bactériens et le surnageant est congelé à -18°C pour agréger les fragments membranaires. Ces derniers sont ensuite sédimentés par une centrifugation de 2h à 50.000g. Les culots sont resuspendus puis dialysés dans de l'eau bidistillée. La dernière étape est la lyophilisation des OMVs.

4. Purification des LPS de *B. abortus* 2308

Le LPS de *B. abortus* est extrait à l'aide d'un mélange eau-phénol (68°C) sur un matériel de départ équivalent à 60 g de bactéries lyophilisées à l'acétone. Le LPS, isolé dans la phase phénolique, est ensuite solubilisé dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) puis, un volume de 2,5 ml de NaI 4 M est ajouté à la solution pour rompre les liens covalents qui lient encore les LPS

à des contaminants (protéines, acides nucléiques, polysaccharides). Après 20 minutes d'incubation, les LPS sont précipités à l'aide de 15 ml de méthanol froid, durant 1 heure et à 4°C. Le précipité est ensuite solubilisé dans 2,5 ml de DMSO. L'étape de précipitation est répétée 6 fois, et lors de la 6^e précipitation, le précipité est resuspendu dans 10 ml d'eau bidistillée. Après dialyse dans de l'eau bidistillée également, le matériel est lyophilisé. 44 mg d'échantillon sont ensuite dissous dans 2,5 ml d'une solution composée de tampon Tris-hydrochloride 0,05 M pH 8,1 ; NaI 2 M ; Tween 40 5 %, puis purifiés par chromatographie sur une colonne Sephadex G-200. Les LPS purifiés obtenus sont dialysés à nouveau, puis lyophilisés (Moreno et al., 1979).

5. Dosage de LPS

La quantification des LPS est réalisée par la méthode colorimétrique au purpald (sonde) qui détecte les deux unités de 3-deoxy-D-manno-2-acide octulosonique (KDO) présentes sur la molécule de LPS de *Brucella* spp.

50µl (volume final) d'échantillon et un standard (3-deoxy-D-manno-2-acide octulosonique (KDO) : 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5 mM) sont incubés durant 25 minutes en présence de 50µl de NaIO₄ 32 mM. Ensuite, 50µl de réactif de purpald 136 mM (Sigma Aldrich) dans du NaOH 2N sont ajoutés. Après 20 minutes d'incubation, 50µl de NaIO₄ 64 mM sont ajoutés aux puits pour une durée de 20 minutes à nouveau. Les bulles d'air sont éliminées par l'addition de 20 µl d'isopropanol. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad). Les valeurs obtenues sont exprimées en mM de KDO. Ces valeurs doivent être divisées par deux, puisqu'une molécule de LPS contient deux KDO (Lee and Tsai, 1999).

6. Immunofluorescence

La technique d'immunofluorescence est un moyen de mettre en évidence des constituants de la cellule grâce à un système de reconnaissance par un anticorps primaire. Celui-ci est alors reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome.

Les OMVs (2 µg de protéines) sont incubées sur des macrophages murins Raw 264.7 ensemencés en plaques 12 puits (75% de confluence), durant 3 heures. Ensuite, deux lavages au PBS⁺⁺ (CaCl₂ 0.7 mM et MgSO₄ 0.25 mM) à 37°C et un au PBS⁺⁺ à 4°C sont réalisés. Les cellules sont alors fixées pendant 20 minutes au paraformaldéhyde à 4°C, puis perméabilisées durant 10 minutes avec du triton X-100 0,1% à température ambiante. Le blocage des sites aspécifiques de liaison se fait en incubant les cellules avec de la BSA 1% (bovine serum albumine) pendant 30 minutes. Le LPS de *Brucella abortus* est détecté grâce à un anticorps monoclonal anti-LPS (A76/12G12/F12) (Cloeckaert et al., 1993), suivi d'un anticorps secondaire anti-souris produit chez la chèvre conjugué à l'Alexa-488 (Molecular probes). L'actine, qui représente les microfilaments du cytosquelette de la cellule est marquée avec un anticorps phalloïdine conjugué à l'Alexa-633 (Molecular probes). L'étape finale est le montage des lamelles sur Mowiol ; la fluorescence est observée grâce à un microscope confocal Leica TCD utilisant un photomultiplicateur constant.

7. Western-blot

Cette technique permet la détection de protéines spécifiques présentes dans un échantillon biologique. La première étape est la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel SDS-PAGE. La deuxième étape est le transfert des

protéines sur une membrane qui est ensuite incubée en présence d'un anticorps primaire, puis secondaire afin de permettre l'immunomarquage des protéines d'intérêt. Et enfin, la dernière étape consiste à révéler le marquage.

7.1. Méthode ECL plex

Un volume égal (15µl) de chacune des 8 fractions du gradient d'optiprep est séparé par la technique d'électrophorèse SDS-PAGE (15% d'acrylamide). Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de PVDF spécifique pour la fluorescence (Amersham Hybond LFP, GE Healthcare). La membrane est ensuite saturée durant 1 heure dans une solution de lait en poudre Nestlé (5% w/v) dilué dans du PBS Tween 0,1%. La membrane est alors incubée pendant la nuit (4°C) en présence des anticorps qui reconnaissent les différentes Omps testées (Omp 16: A76/8C3/G03; Omp 19: A68/25H/10A05; Omp 25: A68/4B10/F05) (Cloekaert et al., 1990) (Cloekaert et al., 1991), puis, elle est incubée durant 1h avec un anticorps anti-souris produit chez la chèvre conjugué à la Cyanine 5 (GE Healthcare). Le signal de fluorescence est détecté par scanning de la membrane par le « Typhoon TM fluorescence scanning system » (GE Healthcare).

7.2. Méthode HRP

Un volume égal (15µl) de chacune des 8 fractions du gradient d'optiprep est séparé par la technique d'électrophorèse SDS-PAGE (15% d'acrylamide). Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de PVDF (Amersham Hybond-P, GE Healthcare), qui subit un blocage des sites aspécifiques de liaison durant 1 heure dans une solution de lait en poudre (5% w/v) dilué dans du PBS Tween 0,1%. La membrane est alors incubée durant toute la nuit à 4°C en présence des anticorps qui reconnaissent les différentes Omps testées (Omp 36/38: A63/8D8/C07; Omp 89: A53/10B2/A01) (Cloekaert et al., 1990) (Cloekaert et al., 1991), puis, elle est incubée 1h en présence d'un anticorps anti-souris produit chez la chèvre, conjugué à la peroxydase HRP (DakoCytomation). Après 1 minute de contact avec le réactif de chémoluminescence (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, PerkinElmer), l'émission de lumière est capturée sur un film photographique par exposition de la membrane. Le temps d'exposition varie d'une expérience à l'autre et est fonction de l'intensité du signal.

8. Dot blot

Le dot blot est une technique similaire au western blot à l'exception que les échantillons ne subissent pas d'électrophorèse. Par conséquent, le signal observé par cette technique ne permet pas de repérer la protéine d'intérêt selon son poids moléculaire. Nous avons utilisé cette technique car la séparation par électrophorèse SDS-PAGE des LPS aboutit à l'observation de nombreuses bandes, qui sont visualisées comme une trainée. Le signal détecté n'est donc pas exploitable.

2µl d'échantillon sont déposés sur membrane de nitrocellulose (GE Healthcare). Il faut s'assurer que les échantillons ont pénétré la membrane, celle-ci doit donc être bien sèche avant de poursuivre l'expérience. Deux méthodes ont été utilisées.

8.1. Méthode HRP

Une fois la membrane bien sèche, celle-ci est incubée pendant 1h dans une solution de blocage à base de lait en poudre 5% dilué dans du PBS Tween 0,1% dans le but de bloquer les sites de liaison aspécifiques. Le LPS de *Brucella abortus* est détecté grâce à un anticorps

monoclonal anti-LPS (A76/12G12/F12) (Cloeckaert et al., 1993). La membrane est ensuite incubée 1h en présence d'un anticorps secondaire anti-souris produit chez la chèvre, conjugué à la peroxydase HRP (DakoCytomation). Après 1 minute de contact avec le réactif de chémoluminescence (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, PerkinElmer), l'émission de lumière est capturée par exposition de la membrane sur un film photographique. Le temps d'exposition varie d'une expérience à l'autre et est fonction de l'intensité du signal.

8.2. Méthode infrarouge

Une fois la membrane bien sèche, celle-ci est incubée pendant 1h dans une solution de blocage composée de BSA 1% diluée dans du PBS Tween 0,1% dans le but de bloquer les sites de liaison aspécifiques. Le LPS de *Brucella abortus* est détecté grâce à un anticorps monoclonal anti-LPS (A76/12G12/F12) (Cloeckaert et al., 1993). L'anticorps secondaire anti-souris produit chez la chèvre, conjugué à un fluorophore excitable à 800nm est incubé 1h sur la membrane. Une fois celle-ci bien sèche, elle est finalement scannée et le signal quantifié à l'aide du Li-Cor (Odyssey Infrared Imaging System, Biosciences).

9. Microscopie électronique

Les fractions 4 à 6, riches en OMVs et obtenues à partir du gradient d'optiprep, sont rassemblées avant de subir une concentration tangentielle (cutt off : 100 kDa) ; un volume final de 50 µl est obtenu. Les OMVs purifiés sont alors déposés sur un filtre percé de pores de 25nm, fixés durant 1 h à la glutaraldéhyde 2,5% puis traités au OsO₄ 1%. Les échantillons sont ensuite déshydratés par étapes successives à l'éthanol, puis enveloppés de résine Epon. Des sections ultrafines de cette résine ont été coupées à l'aide d'un diamant, puis, colorées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb. L'observation des coupes se fait en microscopie électronique à transmission (Tecnai, FEI, Hillsboro, USA).

10. Mesures de la capture phagocytaire

Le jour précédant l'expérience, des plaques 24 puits sont ensemencées avec des Raw 264,7 à raison de 250 000 cellules par puits. Le jour même, des billes (60 billes par cellule) de latex fluorescentes (Fluorospheres red, Molecular probes) dont le diamètre est de 1µm, sont incubées sur les cellules, en présence ou en absence d'OMVs. A la fin de la période d'incubation, les cellules subissent trois rinçages au PBS à 37°C, et un rinçage au PBS à 4°C. La fluorescence est mesurée par le lecteur de plaques Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific (Ex : 578 nm/Em : 612 nm). Afin de normaliser les résultats, un dosage de l'activité β -galactosidase des échantillons est réalisé (protocole point 9.1).

11. Fractionnement subcellulaire

Le fractionnement subcellulaire est une technique de séparation physique des organelles en fonction de leurs propriétés intrinsèques. La séparation se fait soit par centrifugation différentielle, principalement en fonction de la taille, soit par centrifugation isopycnique, en fonction de la densité de ceux-ci (de Duve et al., 1955) (Beaufays et al., 1964).

Le matériel de départ est constitué de 2 boîtes de Petri (9 cm de diamètre) de cellules Raw 264,7 à 90% de confluence. 3 lavages au PBS à température ambiante sont réalisés, après quoi les Pétri sont placées sur glace pour les 2 rinçages suivants, au sucrose 0,25 M isotonique et

froid cette fois. Les cellules sont ensuite collectées par grattage, puis homogénéisées par sonication durant 2 secondes à 40 W (Ultrasonic processor Sonics Vibra Cell , Analis).

11.1. Centrifugation différentielle

Le lysat cellulaire est centrifugé une première fois à 1 000 g durant 2 minutes afin de sédimenter la fraction N contenant les noyaux et les débris cellulaires. Le surnageant, correspondant à la fraction E (extrait total) est ensuite centrifugé à 4 236 g (Beckman rotor type 50Ti) durant 2 minutes 24 secondes pour permettre l'isolation de la fraction M, enrichie en mitochondries et contenant une faible proportion de lysosomes et de peroxysomes. L'étape suivante est l'ultracentrifugation du surnageant à 41 370 g (Beckman rotor type 50Ti) pendant 2 minutes 52 secondes. Le culot est la fraction L qui est enrichie en lysosomes et peroxysomes. La dernière étape est l'isolement de la fraction microsomale P par ultracentrifugation du surnageant à 81 085 g (Beckman rotor type 50Ti) durant 18 minutes 30 secondes. La fraction soluble S contient tous les éléments non sédimentables (figure 10).

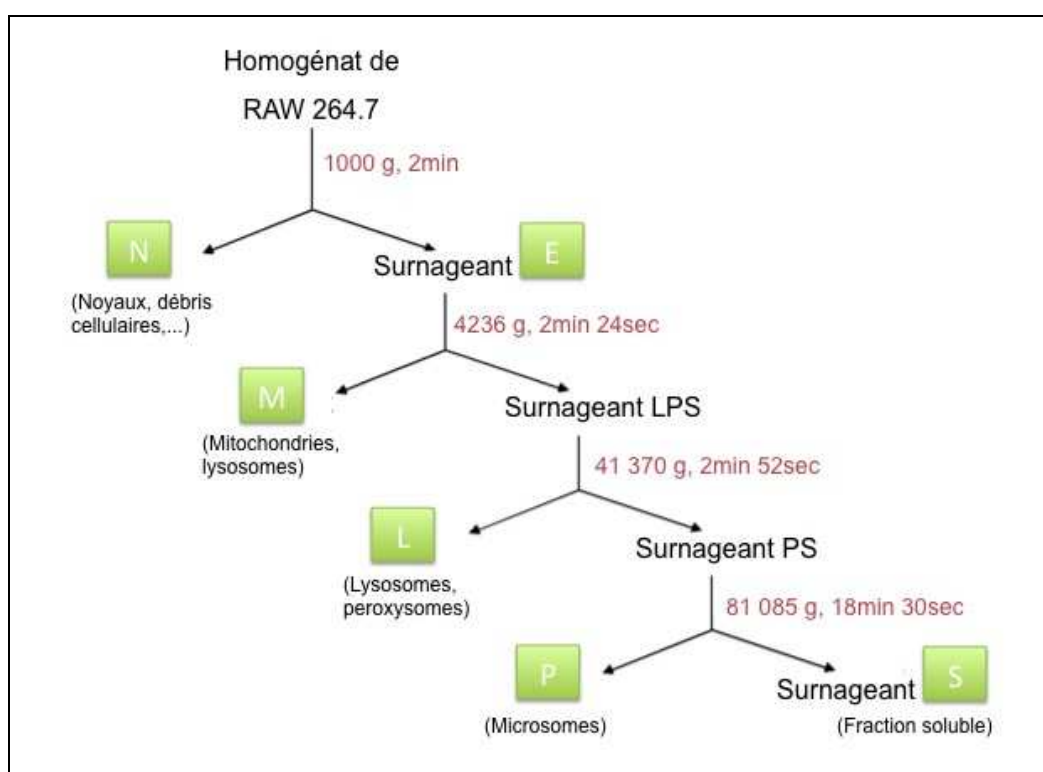


Figure 10 : Illustration du protocole d'isolation des fractions E, N, M, L, P et S par centrifugation différentielle à partir d'un homogénat cellulaire de Raw 264,7.

11.2. Centrifugation isopycnique

Les fractions M, L et P, obtenues par centrifugation différentielle, sont rassemblées et chargées sur ou sous (dans ce cas, les échantillons doivent être amenés à une densité supérieure à $1,26\text{g/cm}^3$) un gradient continu de densité de sucrose préformé ($1,09$ to $1,26\text{g/cm}^3$). Le gradient est alors ultracentrifugé pendant 2h30 à 145.000g (Beckman rotor SW55Ti), afin que les organelles s'équilibrent dans le gradient à leur propre densité. Le gradient est ensuite coupé pour obtenir 13 fractions.

12. Dosages enzymatiques

La distribution des composants cellulaires dans les fractions obtenues par fractionnement est mise en évidence en mesurant l'activité de différents marqueurs enzymatiques.

Enzymes	Compartiments
β -galactosidase	Lysosomes
α -glucosidase alcaline	Réticulum endoplasmique
Cytochrome oxydase	Mitochondries
Catalase	Peroxisomes
Phosphatase alcaline	Membrane plasmique

12.1. β -galactosidase

20 μ l d'échantillons (volume final) sont incubés 30 minutes à 37°C en présence de 180 μ l de la solution de substrat (Acétate 50 mM pH 5,5; TritonX100 0,05%; NaCl 5mM et le substrat methylumbellyferyl- β -galactopyranoside 1 mM, SigmaAldrich) puis, la réaction est arrêtée par l'ajout de 1,2ml de solution de fixation (Tampon Glycine NaOH 50mM pH10,5; EDTA 5mM, TritonX100 0,05%). La fluorescence est mesurée par le lecteur de plaques Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific (Ex : 355nm/Em : 460nm).

12.2. α -glucosidase alcaline

L'activité α -glucosidase alcaline est mesurée en incubant 20 μ l des échantillons (volume final) durant 90 minutes à 37°C en présence de la solution de substrat (Tampon Glycine NaOH 50mM pH10,5; TritonX100 0,02% et le substrat methylumbellyferyl- α -D glucopyranoside 0,1 mM, SigmaAldrich). La réaction est arrêtée par l'ajout de 1,3ml de solution de fixation (identique au dosage précédent). La fluorescence est mesurée par le lecteur de plaques Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific (Ex : 355nm/Em : 460nm).

12.3. Cytochrome oxydase

50 μ l des échantillons (volume final) sont incubés durant 30 secondes avec la solution de substrat (Tampon phosphate 1 mM pH7,4; EDTA 1mM pH7,4; TritonX100 0,04%). L'absorbance est ensuite directement mesurée au spectrophotomètre à 550nm.

12.4. Catalase

50 μ l des échantillons (volume final) sont incubés durant 30 secondes avec du cytochrome C réduit 0,03% (SigmaAldrich) et la solution de substrat (Tampon phosphate 50mM pH7, Triton X100 0,1% et H₂O₂ 10mM). L'absorbance est ensuite directement mesurée au spectrophotomètre à 550nm.

13. Etude de l'internalisation des OMVs par les cellules Raw 264,7

200.000 cellules Raw 264,7 ont étéensemencées en plaques 12 puits la veille de l'expérience. Le jour même, les OMVs (2,5 μ g de protéines) sont incubés sur les cellules pendant des temps croissants. Ensuite, les cellules sont rincées 3 fois au PBS à 37°C et 1 fois au PBS à 4°C. L'étape finale est la lyse des cellules par l'ajout de 200 μ l de tampon RIPA (Tris/HCl 50mM pH 7,4 ; NaCl 120mM ; Triton X100 1% ; SDS 0,1% ; Déoxycholate 1% ;

Inhibiteurs de protéases, Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablets, Roche) dans les puits. Une analyse en dot blot anti-LPS (méthode HRP) des échantillons est finalement réalisée.

14. Distribution intracellulaire des OMVs dans les cellules Raw 264,7

Les cellules Raw 264,7 (2 pétris à 90% de confluence) sont incubées en présence ou en absence d'OMVs (20µg de protéines dans 5ml de DHG). Après le temps d'incubation défini, 3 rinçages au PBS sont réalisés, après quoi les pétris sont placées sur glace pour les 2 rinçages suivants, au sucrose 0,25M isotonique froid cette fois. Les cellules sont ensuite collectées par grattage, puis homogénéisées par sonication durant 2 secondes à 40W (Ultrasonic processor Sonics Vibra Cell, Analis). Le lysat cellulaire subit alors une série de centrifugation différentielles afin d'isoler les fractions E, N, M, L, P et S. Les fractions MLP subissent également une centrifugation isopycnique sur gradient de sucrose.

15. Microscopie à contraste de phase

Les OMVs (4 µg de protéines) ou LPS (0,092 mM) sont incubés sur des macrophages murins Raw 264.7ensemencés sur des lamelles, en plaques 12 puits (75% de confluence). Ensuite, trois lavages au PBS à 37°C et un au PBS à 4°C sont réalisés. Les cellules sont alors fixées pendant 20 minutes au paraformaldéhyde à 4°C, puis 3 nouveaux rinçages au PBS sont réalisés. Après une incubation de 5 minutes avec du NH₄Cl 50mM, suivie des 3 derniers rinçages au PBS, les lamelles sont montées sur Mowiol. La fluorescence est observée grâce à un microscope confocal Leica TCD utilisant un photomultiplicateur constant.

Résultats et discussion

1. Purification des OMVs

L'étape initiale de ce travail repose sur la mise au point du protocole de purification des OMVs de *Brucella abortus* 2308. En effet, aucune production d'OMVs purs de *Brucella* n'a jusqu'à présent été décrite dans la littérature. Ce protocole a donc été récemment élaboré dans le laboratoire (figure 10A) (Protocole détaillé dans « Matériels et méthodes » chap. 3.1.). Une culture de *B. abortus* 2308 (1,6 l) est centrifugée, puis stérilisée par filtration sur un filtre 0,22 µm, avant d'être concentrée 500 fois par filtration tangentielle. Les 1,5 ml récoltés, et enrichis en OMVs, sont déposés sous un gradient discontinu d'Optiprep. Lors de la centrifugation, l'enrichissement en OMVs s'effectue par remontée de ceux-ci dans le gradient, et par élimination des contaminants qui restent dans le fond du gradient. Après cette étape, le gradient est coupé en 8 fractions identiques, et les fractions 1 à 6, contenant le matériel qui a flotté dans le gradient, sont récupérées. Celles-ci sont diluées dans du PBS puis, subissent une ultracentrifugation. Le culot, enrichi en OMVs, est resuspendu dans du PBS et subi, finalement, une filtration stérilisante.

Afin de vérifier que le matériel obtenu à l'issue du processus de purification correspond bien à des OMVs, quelques expériences de caractérisation ont été réalisées. Les 8 fractions obtenues à partir du gradient d'Optiprep ont été analysées en western blot pour détecter les protéines de membrane externe de *Brucella* suivantes : Omp 16, Omp 19, Omp 25, Omp 36/38 et Omp 89), et en dot blot pour détecter les LPS (figure 10B). Les figures indiquent que du matériel contenant de nombreuses protéines de membrane externe ainsi que du LPS flottait dans le gradient, et était principalement présent dans les fractions 3 à 6. Une fois la mesure de densité des fractions effectuée (Figure 10B), nous avons constaté que les OMVs sont principalement présentes dans un intervalle de densité de 1,12 à 1,16 g/cm³. Ces données préliminaires indiquent que des éléments membranaires peuvent être récoltés par flottation.

Ensuite, nous avons étudié, en microscopie électronique à transmission, les fractions 4 à 6 (concentrées). Des vésicules formées d'une simple membrane à double feuillet phospholipidique, et mesurant de 50 à 150 nm, ainsi que quelques fragments membranaires sont visualisés sur les images obtenues (figure 10C). Cela semble confirmer que notre protocole aboutit bien à l'enrichissement d'OMVs de *B. abortus* 2308. Nous ne pouvons, toutefois, pas exclure qu'au vu de la présence de fragments en microscopie électronique, ces vésicules puissent s'assembler et se désassembler constamment (A-C Beguin, thèse en cours).

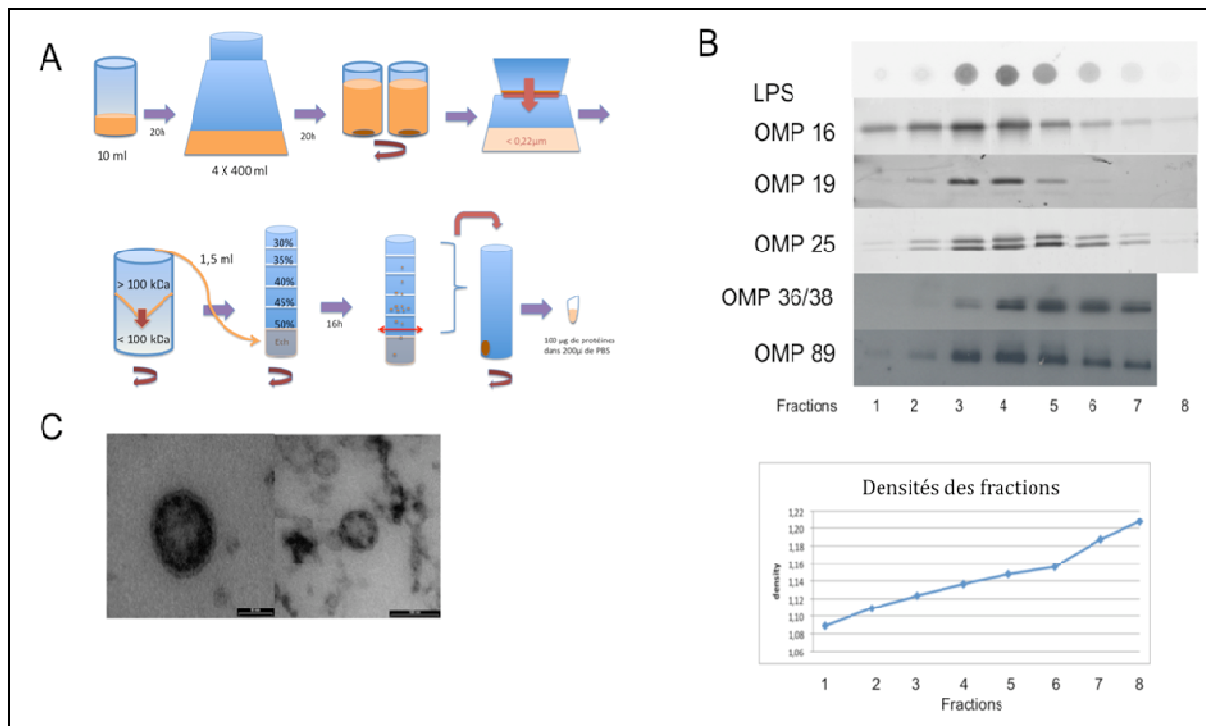


Figure 10 : Protocole de purification et caractérisation des OMVs produits par *Brucella abortus* 2308. A) Les OMVs produites par *B. abortus* 2308 sont purifiées selon le protocole décrit dans « Matériel et méthodes », chap. 3.1. B) Les 8 fractions obtenues à partir d'un gradient d'Optiprep (A) sont analysées en western blot pour détecter les protéines de membrane externe suivantes : Omp 16, Omp 19, Omp 25/27, Omp 36/38 et Omp 89, et en dot blot pour détecter les LPS. Les densités des fractions isolées du gradient d'Optiprep ont été mesurées, et les OMVs sont détectées à des densités comprises entre 1,12 à 1,16 g/cm³. Il semblerait que les Omps puissent s'équilibrer à des densités variables, en fonction de leur type, ce qui pourrait suggérer l'existence de deux populations d'OMVs. C) Micrographie électronique d'OMVs purifiées (mélanges des fractions 4, 5 et 6). Parmi des structures qui apparaissent comme étant des fragments membranaires, nous pouvons identifier des vésicules dont la taille oscille entre 50 et 150 nm de diamètre.

2. Trafic intracellulaire des OMVs

2.1. Endocytose des OMVs

Une fois que le matériel fût caractérisé comme représentant vraisemblablement des OMVs, nous nous sommes intéressés à l'endocytose de ceux-ci dans des macrophages murins, les cellules Raw 264,7. La première étape du travail a été de vérifier que les OMVs de *B. abortus* 2308 étaient bien internalisées dans ces cellules. Nous avons donc tenté de réaliser une cinétique de l'endocytose de ces OMVs. Des OMVs ont été incubées sur les macrophages durant des périodes de temps croissantes, puis les cellules ont été lysées. Une analyse en dot blot nous a permis de révéler la présence de LPS dans les échantillons recueillis (figure 11). Bien que le dot blot ne soit pas véritablement quantitatif, il révèle une augmentation du signal LPS avec le temps (figure 11). Cependant, le témoin négatif, qui correspond à un lysat de cellules Raw 264,7 n'ayant pas été en contact avec des OMVs, est légèrement positif. Ceci suggère que des composants des macrophages Raw 264,7 se lient aspécifiquement aux anticorps. Ce résultat nous laisse penser que les OMVs sont internalisées dans les cellules Raw 264,7. Il nous faut cependant confirmer cette hypothèse en excluant que nos observations résultent d'une adsorption d'OMVs sur les membrane plasmiques des macrophages.

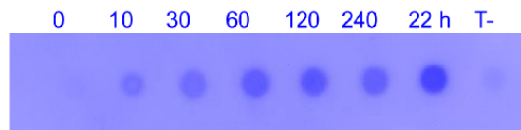


Figure 11 : Cinétique de l'endocytose des OMVs de *B. abortus* dans les cellules Raw 264,7. Les OMVs (2,5 µg de protéines) ont été incubées durant des périodes de temps croissantes (0, 10, 30, 60, 120, 240 minutes et 22 heures) sur les macrophages. Après les lavages adéquats, les cellules ont été lysées à l'aide de tampon RIPA, et les lysats des différentes conditions testées, ont été analysés par la technique du dot blot anti-LPS. Le T- représente des cellules qui n'ont pas été en contact avec des OMVs.

Afin de vérifier que les Raw 264,7 internalisent bien les OMVs, une analyse en microscopie confocale a été réalisée à partir de Raw 264,7 ayant été mises en contact avec des OMVs de *B. abortus* 2308 (2µg de protéines) durant 3h (figure 12). Les LPS, présents sur les OMVs, sont marqués en vert et l'actine, qui compose les microfilaments du cytosquelette de la cellule, est marquée en bleu (figure 12A). La superposition des images suggère que les OMVs sont internalisés. La morphologie cellulaire, qui a été reconstituée à partir de coupes optiques en suivant les axes X et Y, confirme, en effet, que le signal LPS se trouve bien à l'intérieur des cellules (figure 12B).

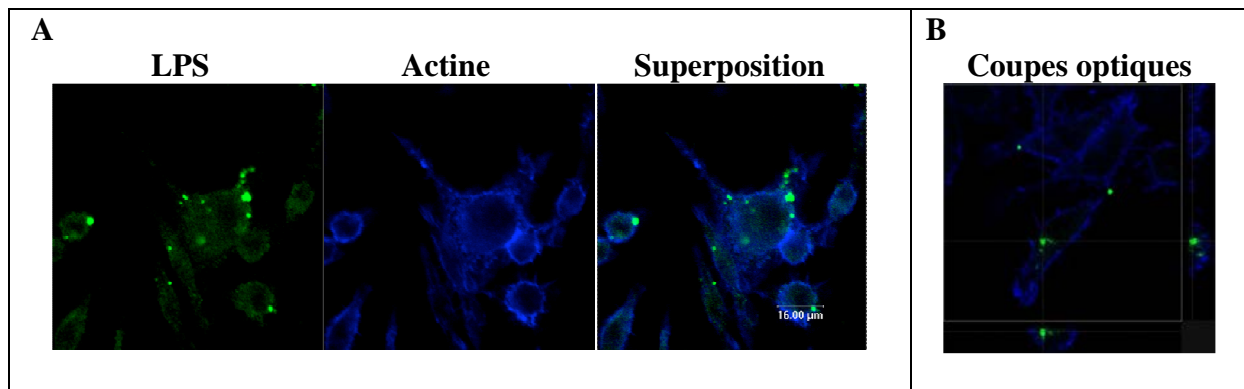


Figure 12 : Endocytose des OMVs de *B. abortus* 2308 par des macrophages murins Raw 264,7. Des OMVs (2 µg de protéines) ont été incubées pendant 3h sur les cellules Raw 264,7. Le LPS de *B. abortus* est détecté par un anticorps monoclonal anti-LPS, suivi par un anticorps anti-souris couplé à la l'Alexa-488, le LPS apparaît en vert. L'actine, en bleu, est marquée par un anticorps anti-phalloïdine conjugué à l'Alexa-633. A) Les marquages du LPS et de l'actine sont visualisés séparément, puis sont superposés. Le signal LPS, représentant les OMVs, semble être intracellulaire. B) Des coupes optiques des cellules, à partir desquelles la morphologie cellulaire a été reconstituée en suivant les axes X et Y, démontrent, en effet, que le LPS se trouve à l'intérieur des macrophages Raw 264,7.

Ces résultats indiquent que les OMVs produites par *B. abortus* 2308 sont donc bien internalisées dans les macrophages murins Raw 264,7, puisqu'elles sont détectées à l'intérieur de ces cellules après 3h d'incubation.

2.2. Distribution intracellulaire des OMVs

2.2.1. Mises au point

Maintenant que nous savons que les OMVs de *B. abortus* 2308 sont internalisées par les cellules Raw 264,7, nous avons tenté de nous pencher sur leur devenir intracellulaire. La technique du fractionnement subcellulaire a alors été envisagée. L'étape primordiale avant d'engager ce type d'étude a été la mise au point du protocole d'homogénéisation des cellules

Raw 264,7. Cette homogénéisation a pour objectif de rompre uniquement les membranes plasmiques, afin de libérer les organites cellulaires qui pourront alors être analysés par centrifugation. Cette étape est donc déterminante de la qualité des expérimentations. Nous avons, tout d'abord, testé la méthode d'homogénéisation classique au Dounce, mais les Raw 264,7 sont, après ce traitement, visualisées intactes au microscope optique. Après 80 passages à travers une seringue 25G, les macrophages sont visuellement endommagés. Cependant, des analyses supplémentaires ont révélé qu'après fractionnement, une forte activité de la β -galactosidase lysosomale est présente dans la fraction non sédimentable S, ce qui signifie que cette méthode d'homogénéisation n'est pas appropriée, car, même si elle rompt la membrane plasmique, elle détruit également la membrane des organites (la β -galactosidase étant une enzyme soluble des lysosomes). Ensuite, l'homogénéisation par sonication a été testée. Des cellules Raw 264,7 ont été soumises à différentes durées de sonication (3 s, 4 s, 5 s, 10 s et 15 s à 40 W). C'est l'homogénéisation par sonication, d'une durée de 3 s à 40 W qui semble être un procédé adapté à ce type de cellules. En effet, après fractionnement, une grande proportion de l'activité β -galactosidase est présente dans les fractions MLP (65 % d'activité) en comparaison aux fractions N et S (18 % et 17 % d'activité respectivement). Nous avons donc choisi d'appliquer ce protocole d'homogénéisation des macrophages Raw 264,7 avant chaque expérience de fractionnement subcellulaire.

Nous avons incubé des OMVs sur les cellules Raw 264,7 durant des périodes de temps croissantes, puis nous avons réalisé un fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle. Les fractions obtenues ont ensuite été analysées en dot blot anti-LPS (figure 13). Le témoin négatif correspond à des cellules Raw 264,7 qui ont été incubées en absence d'OMVs. De la même manière que dans l'expérience précédente, réalisée avec le même anticorps (figure 12), le témoin négatif est légèrement positif. Bien que la méthode employée ne soit pas véritablement quantitative, et qu'il n'y ait pas d'équivalence entre les échantillons déposés sur la membrane, en terme de protéines ou de concentration en LPS, nous pouvons déduire que la technique révèle la présence de matériel dans les différentes fractions.

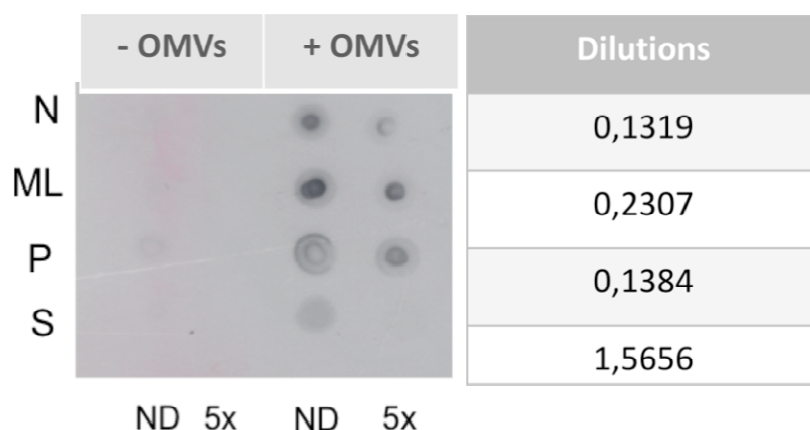


Figure 13 : Distribution intracellulaire des OMVs de *B. abortus* 2308 dans les macrophages Raw 264,7. Les cellules ont été incubées 1 heure en présence (+ OMVs) ou en absence (- OMVs) d'OMVs, après quoi ces mêmes cellules ont été soumises à des centrifugations différentielles. Les fractions E, N, M, L, P et S sont isolées puis, 2 μ l de chaque fraction sont analysés en dot blot anti-LPS. « ND » représente les échantillons non dilués et « 5x » correspond à des échantillons dilués 5 fois avant d'être chargés sur la membrane. Les dilutions primaires des fractions obtenues pour la condition « + OMVs » sont indiquées à droite de l'image et correspondent aux dilutions réalisées à partir de l'homogénat de départ. Il semble que nous puissions détecter des OMVs dans les fractions.

Un signal LPS a pu être détecté dans les fractions isolées à la fin des étapes de centrifugations différentielles. Par conséquent, nous concluons qu'il est techniquement possible d'étudier le trafic intracellulaire des OMVs dans les Raw 264,7, en suivant la distribution des LPS à travers les fractions d'un homogénat de Raw 264,7 ayant subi des centrifugations différentielles. Le seul problème est que cette méthode de dot blot HRP ne permet pas de quantification précise du signal. Nous avons donc envisagé la méthode quantitative ECL-plex (« Matériel et méthodes » chap. 7.1., décrite pour le western blot), qui a échoué en raison de son manque de sensibilité. Et enfin, nous avons testé une méthode de détection du signal en infrarouge (« Matériel et méthodes chap. 8.2.), qui est à la fois sensible et quantitative. Cette méthode a donc été choisie pour quantifier le signal LPS de nos échantillons.

2.2.2. Distribution intracellulaire des OMVs purifiées aux FUNDP

2.2.2.1. Fractionnement subcellulaire par centrifugations différentielles

Afin d'avoir une idée du profil de distribution, en fractionnement subcellulaire, des organites présents dans les cellules Raw 264,7 nous avons mesuré l'activité de quelques enzymes marqueurs de compartiments subcellulaires, à partir d'un fractionnement de cellules Raw 264,7. Parmi ces enzymes, nous avons testé la β -galactosidase acide (lysosomes), la cytochrome oxydase (mitochondries), l' α -glucosidase alcaline (réticulum endoplasmique), et la catalase (peroxysomes) (Figure 14). Il est important de signaler que les 4 graphes de la figure 14 représentent des expériences indépendantes, présentant des taux de récupération acceptables (entre 80 et 125 %) (la récupération est définie par la somme des mesures d'activité dans chacune des fractions, divisée par l'activité totale de l'homogénat). L'ordonnée des graphes représente l'activité spécifique relative (ASR, définie par le pourcentage d'activité mesurée dans une fraction divisé par le pourcentage de protéines dans la fraction correspondante). L'abscisse représente le pourcentage de protéines calculé dans les différentes fractions. Les activités β -galactosidase et cytochrome oxydase sont principalement présentes dans les fractions M et L (surface des blocs), avec un enrichissement dans L (hauteur du bloc). L'activité α -glucosidase alcaline présente un pourcentage important d'activité dans les fractions N, M et P. Et finalement, l'activité catalase est principalement présente dans les fractions L et P.

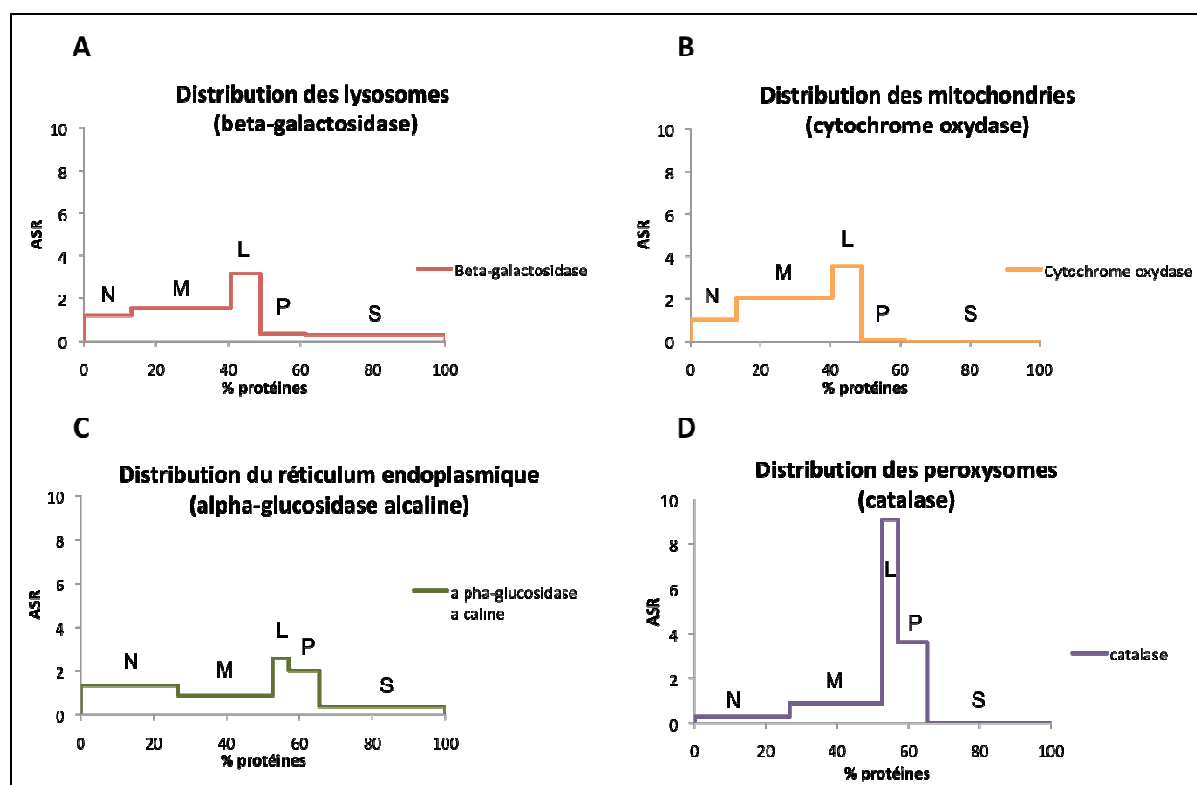


Figure 14 : Divers dosages enzymatiques réalisés à partir des fractions issues de fractionnements subcellulaires par étapes successives de centrifugations différentielles de cellules Raw 264,7. Les graphes représentent l'activité spécifique relative (ASR, définie par le pourcentage d'activité mesurée dans une fraction, divisée par le pourcentage de protéines mesuré dans la fraction correspondante). L'abscisse représente le pourcentage de protéines calculé dans les différentes fractions. A) L'activité β -galactosidase est principalement dans les fractions M et L (M : 42,43 % et L : 25,99 %) B) L'activité cytochrome oxydase est principalement dans les fractions M et L également (M : 56,2 % et L : 29,1%). C) L'activité α -glucosidase alcaline se trouve majoritairement dans les fractions N (35,4%), M (22,56%) et P (11,18%). D) L'activité catalase est principalement détectée dans les fractions L (39,21%) et P (30%).

Nous avons alors incubé des OMVs de *B. abortus* 2308 (à raison de 20 μ g de protéines dans 5 ml de milieu) sur les cellules Raw 264,7 (2 Pétri, 90 % de confluence). Différents temps d'incubation (1 heure et 2 heures) et de chasse (0 à 20 heures) ont été testés dans le but d'obtenir une cinétique du trafic des OMVs dans la cellule. Après la période de contact, les cellules ont subi un rinçage avec du milieu de culture, afin d'éliminer les OMVs résiduelles. Puis, des périodes de temps de chasse croissantes ont été appliquées à 37°C, avant la récolte des cellules et le fractionnement subcellulaire. Des centrifugations différentielles ont permis d'isoler les fractions E, N, M, L, P et S. Ensuite, des dosages enzymatiques et une analyse en dot blot anti-LPS quantitative ont été réalisés à partir des différentes fractions obtenues. L'objectif était de détecter une potentielle association entre les OMVs et un ou plusieurs compartiments subcellulaires (figure 15). Les graphiques expriment l'activité spécifique relative (ASR, pour les enzymes) ou l'intensité spécifique relative (ISR, pour les LPS) en fonction du pourcentage de protéines des fractions. Ceux-ci présentent des taux de récupération acceptables (entre 80 et 110 %) pour les enzymes, et plus variables pour le signal LPS, ce qui est dû à la technique de détection utilisée. Le signal LPS a été considéré en valeur absolue, et assimilé à l'activité enzymatique. Nous constatons que les OMVs sont majoritairement présents dans les fractions M, L et P. Quelque soit le temps de contact et de chasse, le signal LPS est relativement constant au cours du temps.

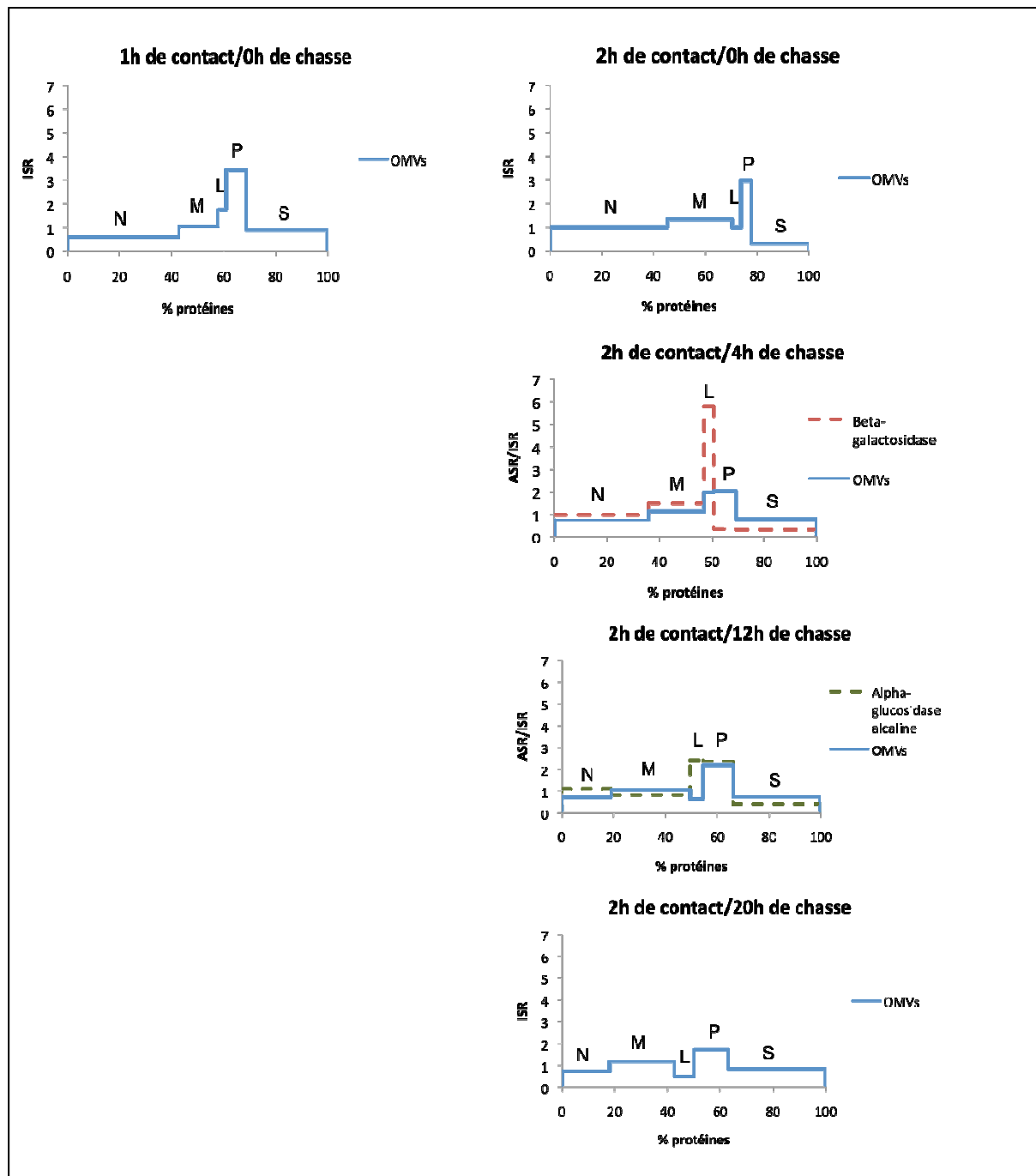


Figure 15 : Distributions intracellulaires des OMVs de *B. abortus* 2308, représentée par des graphes issus de fractionnements subcellulaires par centrifugations différentielles de Raw 264,7 ayant été incubées avec ces OMVs. Différentes périodes de contact et de chasse sont illustrées. Des Raw 264,7 (2 Pétris) ont été incubées avec des OMVs (20 µg dans 5 ml de milieu) durant des périodes de temps croissantes (1 heure ou 2 heures de contact et de 0 à 20 heures de chasse). Les graphes représentent la distribution des OMVs de *B. abortus* 2308 dans les 5 fractions obtenues à l'issue des centrifugations différentielles. Les dosages des activités de β -galactosidase et α -glucosidase alcaline nous ont permis d'établir une distribution représentative de ces enzymes dans les fractions (pointillés). L'activité spécifique relative (ASR, pour les enzymes) / l'intensité spécifique relative (ISR, pour les LPS) est exprimée en fonction du pourcentage de protéines. Les fractions L et P sont enrichies en OMVs.

L'observation des graphiques nous laissant envisager que les OMVs sont en majorité présents dans la somme des fractions M, L et P quelque soit le temps de chasse, nous avons additionné les intensités de signal LPS mesurées dans les fractions M, L et P pour toutes les conditions testées (figure 16). La figure 16 montre qu'environ 50% du signal LPS est présent

dans les fractions M, L et P dans toutes les conditions testées. Cependant, il n'est pas possible de conclure à des évolutions de la distribution des OMVs au cours du temps sans multiplier ce genre d'expériences.

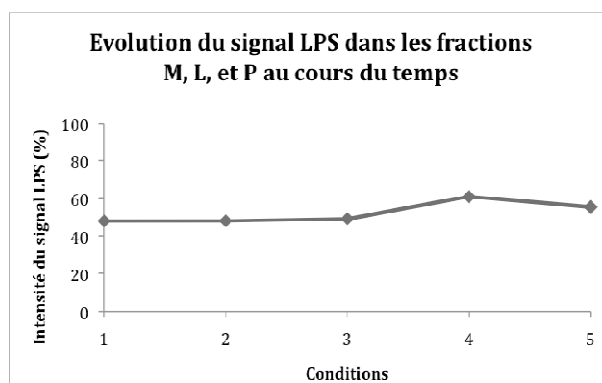


Figure 16 : Evolution du signal LPS dans les fractions M, L et P au cours du temps sur base des résultats illustrés dans la figure 15. 1) 1h de contact/0h de chasse. 2) 2h de contact/0h de chasse. 3) 2h de contact/4h de chasse. 4) 2h de contact/12h de chasse. 5) 2h de contact/20h de chasse. Les intensités du signal LPS des fractions M, L et P ont été additionnées pour chacune des conditions testées précédemment (figure 15). Environ 50% du signal LPS est présent dans les fractions M, L et P pour toutes les conditions testées.

Afin de s'assurer que les LPS ne sont pas dégradés par la cellule au fil du temps, ce qui pourrait compromettre l'interprétation de nos résultats, nous avons contrôlé l'intensité du signal LPS dans l'homogénat total (signal LPS des fractions E et N additionné) pour toutes les conditions. Nous observons des fluctuations du signal LPS, probablement causées par la technique de détection du signal, mais nous n'observons aucune tendance de diminution du signal LPS au cours du temps. Ceci est en accord avec un article qui décrit la non-dégradation des LPS de *Brucella* dans la cellule après de longues périodes de temps (Forestier et al., 1999). La détection du LPS de *Brucella* comme marquage des OMVs semble donc être une méthode appropriée pour suivre la distribution intracellulaire des OMVs.

2.2.2.2. Fractionnement subcellulaire par centrifugation isopycnique

La technique de centrifugation isopycnique sur gradient continu de densité de sucrose (1,09 à 1,23 g/ml) a alors été abordée. Celle-ci permet une séparation plus analytique des composants cellulaires en fonction de leur densité. Comme le signal LPS était principalement détecté dans les fractions M, L et P (figure 16), ces fractions ont été regroupées avant d'être chargées sur un gradient de sucrose (1,09 à 1,26 g/ml). Les graphes de la figure 17 illustrent les résultats obtenus après centrifugation isopycnique. Les taux de récupération obtenus sont corrects, hormis ceux obtenus pour le dosage de l' α -glucosidase alcaline, qui étaient toujours excédentaires (entre 145 et 200 %). Cependant, nous avons tout de même pris la décision de les présenter car la reproductibilité des profils enzymatiques générés nous a conforté quant à la fiabilité des résultats (médianes comprises entre 1,1809 et 1,189 g/ml). Après 1 heure de contact entre les cellules et les OMVs, il est possible de détecter un signal LPS dans le fond du gradient, à savoir à des densités élevées (environ 1,23 g/ml). Au fur et à mesure que le temps de contact ou de chasse augmente, les OMVs s'équilibrent à des densités de plus en plus faibles. Seule la condition 2h de contact/4h de chasse s'oppose à cette tendance générale. Cette condition, au même titre que les autres, aurait dû être reproduite, mais par manque de temps, cela n'a malheureusement pu être réalisé.

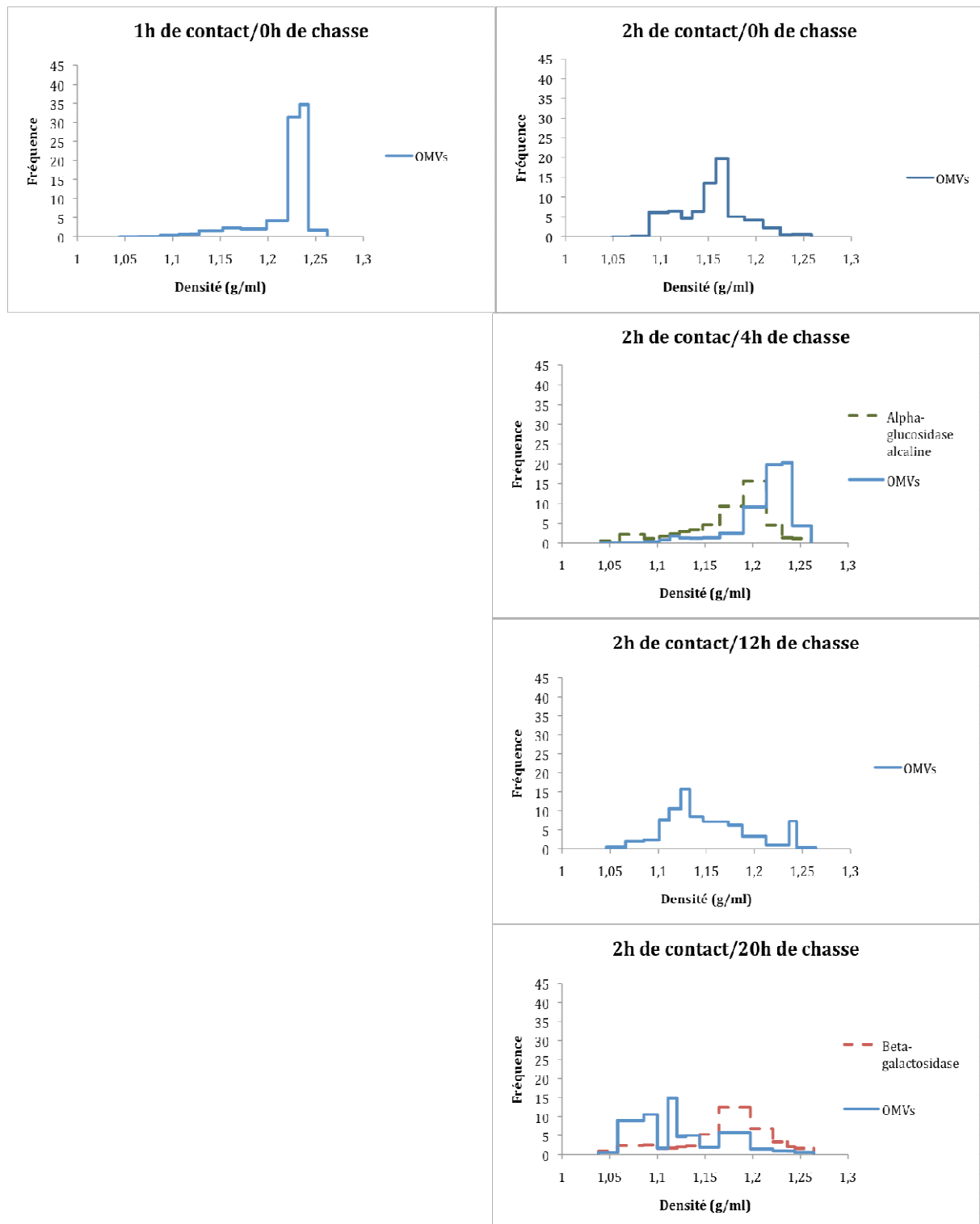


Figure 17 : Distribution intracellulaire des OMVs de *B. abortus* 2308, représentée par des graphes issus de fractionnements subcellulaires par centrifugation isopycnique de Raw 264,7 ayant été incubées avec ces OMVs. Différentes périodes de contact et de chasse sont illustrées. Des Raw 264,7 (2 Pétris) ont été incubées avec des OMVs (20 µg dans 5 ml de milieu) durant des périodes de temps croissantes (1 heure ou 2 heures), suivies de périodes de chasse (0 à 20 heures). Après une série de centrifugations différentielles, les fractions M, L et P ont été rassemblées puis chargées sur gradient de sucrose (1,09 à 1,26 g/cm³). 13 fractions sont récoltées après centrifugation isopycnique du gradient. Les dosages des activités de β -galactosidase et α -glucosidase alcaline nous ont permis d'établir une distribution représentative de ces enzymes dans les fractions (pointillés). Les graphes bleus représentent la distribution des OMVs de *B. abortus* 2308 (révélés par leur LPS) dans les différentes fractions. La fréquence est exprimée en fonction de la densité des fractions (g/ml). Les OMVs semblent avoir une tendance générale à s'équilibrer à des densités de plus en plus faibles lorsque le temps de chasse augmente.

Il aurait été notamment intéressant de réaliser deux expériences complémentaires à celles-ci. D'une part, une expérience de centrifugation réalisée avec des OMVs seules, en utilisant les mêmes conditions de centrifugations différentielles, afin d'évaluer les caractéristiques intrinsèques de sédimentation et d'équilibration dans le gradient, des OMVs elles-mêmes. D'autre part, des fractionnements cellulaires d'homogénats de cellules Raw 264,7 auxquels des OMVs ont été ajoutés à posteriori mériteraient d'être réalisés également, afin de distinguer l'internalisation des OMVs de leur simple adsorption sur des membranes diverses. Malgré tout, les données collectées nous apportent certaines informations. Les OMVs semblent être associés à des compartiments de moins en moins denses au cours du temps. Cependant, cette approche par centrifugation ne permet pas de préciser l'identité des compartiments qui hébergent les OMVs au cours du temps. Notons, toutefois, que cette modification de distribution est une nouvelle indication que les OMVs de *B. abortus* 2308 sont internalisés par les Raw 264,7 et subissent une évolution intracellulaire dans la cellule, au cours du temps.

Nous avons voulu, ensuite, comparer les résultats obtenus par la détection du signal LPS avec des résultats qui seraient générés par la détection d'un autre composant des OMVs, afin de s'assurer que le LPS est un bon marqueur des OMVs ; nous avons choisi Omp 25. En guise de rappel, Omp 25 est une protéine de membrane externe de *Brucella* dont la présence a été démontrée dans les OMVs que nous purifions (figure 10). On s'attend, par conséquent, à ce que la distribution intracellulaire des OMVs détectées avec un anticorps anti-LPS et avec un anticorps anti-Omp 25 soient identiques. Et c'est globalement ce que nous avons observé. La figure 18 illustre une des conditions testées. Ces résultats sont un argument supplémentaire pour affirmer que nous détectons bien des OMVs de *Brucella* dans nos échantillons.

Détection d'Omp25

Détection des LPS

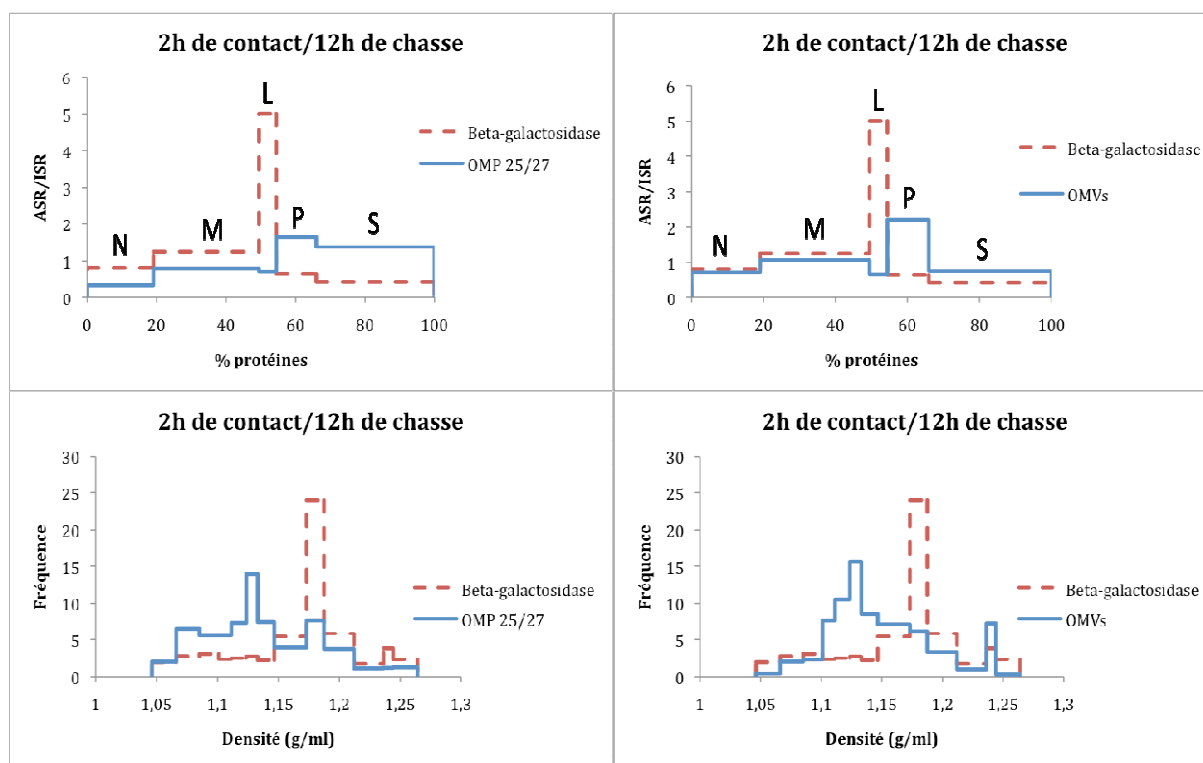


Figure 18 : Vérification que les détections des OMVs par les LPS et par OMP 25/27 fournissent les mêmes profils de distribution intracellulaire. De la même façon que pour la figure 15, la distribution intracellulaire des OMVs a été étudiée par la méthode de fractionnement cellulaire. Les panneaux du haut illustrent des résultats générés par centrifugations différentielles et les panneaux du bas illustrent des résultats générés par centrifugation isopycnique. Les OMVs ont été tracées d'une part, par la détection du LPS, et d'autre part, par la détection des protéines de membrane externe Omp 25/27. Les deux types de détection fournissent des résultats similaires.

2.2.3. Distribution intracellulaire des OMVs lyophilisées

2.2.3.1. Fractionnement subcellulaire par centrifugations différentielles

Nous avons eu l'opportunité de reproduire le même type de distribution intracellulaire des OMVs, avec des OMVs lyophilisées de *B. abortus* 2308, envoyées de l'Université de Pamplona (Espagne) par le Pr. I. Moriyon (méthode de purification détaillée dans « Matériel et méthodes » chap. 3.2.) Nous avons donc incubé des OMVs de *B. abortus* 2308 lyophilisées sur les cellules Raw 264,7. Différents temps d'incubation et de chasse ont été testés dans le but d'obtenir une ébauche du destin de ces OMVs dans la cellule. Après la période d'incubation (30 minutes, 1 heure ou 2 heure), les cellules ont subi un rinçage avec du milieu de culture, afin d'éliminer les OMVs résiduelles. Puis, des périodes de temps de chasse croissantes ont été appliquées (de 0 à 20 heures), avant la récolte des cellules et le fractionnement subcellulaire. Des centrifugations différentielles ont permis d'isoler les fractions E, N, M, L, P et S. Ensuite, des dosages enzymatiques et une analyse en dot blot anti-LPS quantitative ont été réalisés à partir des différentes fractions obtenues. Nous avons, cependant, été confrontés à un problème de solubilisation de ce matériel membranaire lyophilisé. Nous avons tenté de soniquer la suspension, sans véritable amélioration de la solubilité. Par conséquent, il nous était très difficile de réaliser des dosages protéiques reproductibles, et cela nous a empêché de déposer précisément la même quantité d'OMVs sur les cellules, que lorsque nous utilisons les OMVs purifiées par nos soins (à savoir 20µg de

protéines). L'expérience a été tout de même réalisée, et les résultats sont exposés dans les figures 19 et 20. Les données issues des centrifugations différentielles (figure 19) montrent que les OMVs lyophilisés sont majoritairement enrichies dans les fractions L et P. Cette distribution est extrêmement stable dans le temps.

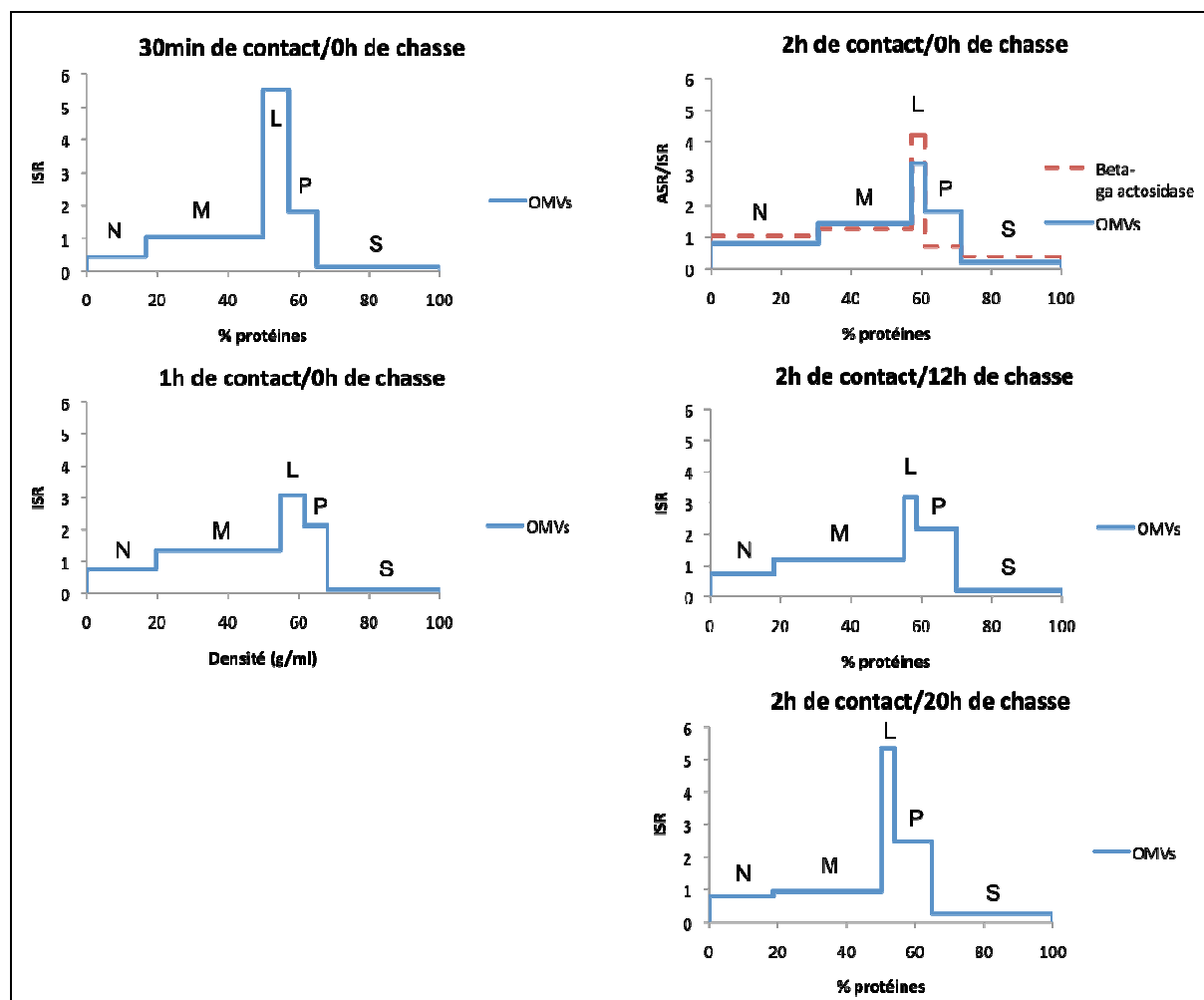


Figure 19 : Distribution intracellulaire des OMVs lyophilisés de *B. abortus* 2308, représentée par des graphes issus de fractionnements subcellulaires par centrifugation différentielle de Raw 264,7 ayant été incubées avec ces OMVs lyophilisés. Différentes périodes de contact et de chasse sont illustrées. Des Raw 264,7 (2 Pétris) ont été incubées avec des OMVs lyophilisés (20 µg dans 5 ml de milieu) durant des périodes de temps croissantes (30 minutes, 1 heure ou 2 heures) suivies de périodes de chasse croissantes (de 0 à 20 heures). Les graphes représentent la distribution des OMVs lyophilisés de *B. abortus* 2308 dans les 5 fractions obtenues à l'issue des centrifugations différentielles. Le dosage de l'activité β -galactosidase nous a permis d'établir une distribution représentative de cette enzyme dans les fractions (pointillés). L'activité spécifique relative (ASR, pour les enzyme) / l'intensité spécifique relative (ISR, pour les LPS) est exprimée en fonction du pourcentage de protéines. Les fractions L et P sont enrichies en OMVs dans toutes les conditions testées.

2.2.3.2. Fractionnement subcellulaire par centrifugation isopycnique

De la même façon que pour les expériences réalisées avec des OMVs purifiées au laboratoire, nous avons rassemblé les fractions M, L et P isolées par centrifugation différentielle à partir d'homogénats de cellules Raw 264,7 ayant été en contact avec des OMVs lyophilisés. Différents temps de contact (30 minutes, 1 heure ou 2 heures) et de chasse (de 0 à 20 heures) ont été appliqués. Le mélange des 3 fractions ont ensuite été chargé sur un gradient continu de sucrose (1,09 à 1,26 g/ml). Les graphes de la figure 20, pour lesquels les taux de récupération sont acceptables, illustrent les résultats obtenus après

centrifugation isopycnique. Pour chacune des conditions testées, les OMVs sont détectées dans le fond du gradient. Ce résultat nous paraît assez surprenant. Il se pourrait que les OMVs restent immobiles dans la cellule, ou même qu'elles ne pénètrent pas la cellule et qu'elles soient simplement adsorbées sur des fragments membranaires. Ce résultat diffère, en tous cas, totalement du résultat obtenu lors des fractionnements cellulaires de cellules Raw 264,7 mises en contact avec des OMVs purifiées aux FUNDP (figure 17). Cela souligne que les deux types d'OMVs sont plus différents l'un de l'autre qu'on n'aurait pu le penser à priori. Les OMVs des FUNDP subissent une évolution intracellulaire au cours du temps, alors que les OMVs lyophilisées semblent rester immobiles. L'idéal aurait été de réaliser une expérience dans laquelle des OMVs lyophilisées auraient ajoutées à un homogénat de Raw 264,7. Dans le cas où le profil de distribution aurait été identique à ceux de la figure 20, nous aurions pu avancer l'hypothèse que cette distribution d'OMVs traduise, en fait, la distribution d'agrégats d'OMVs non internalisés.

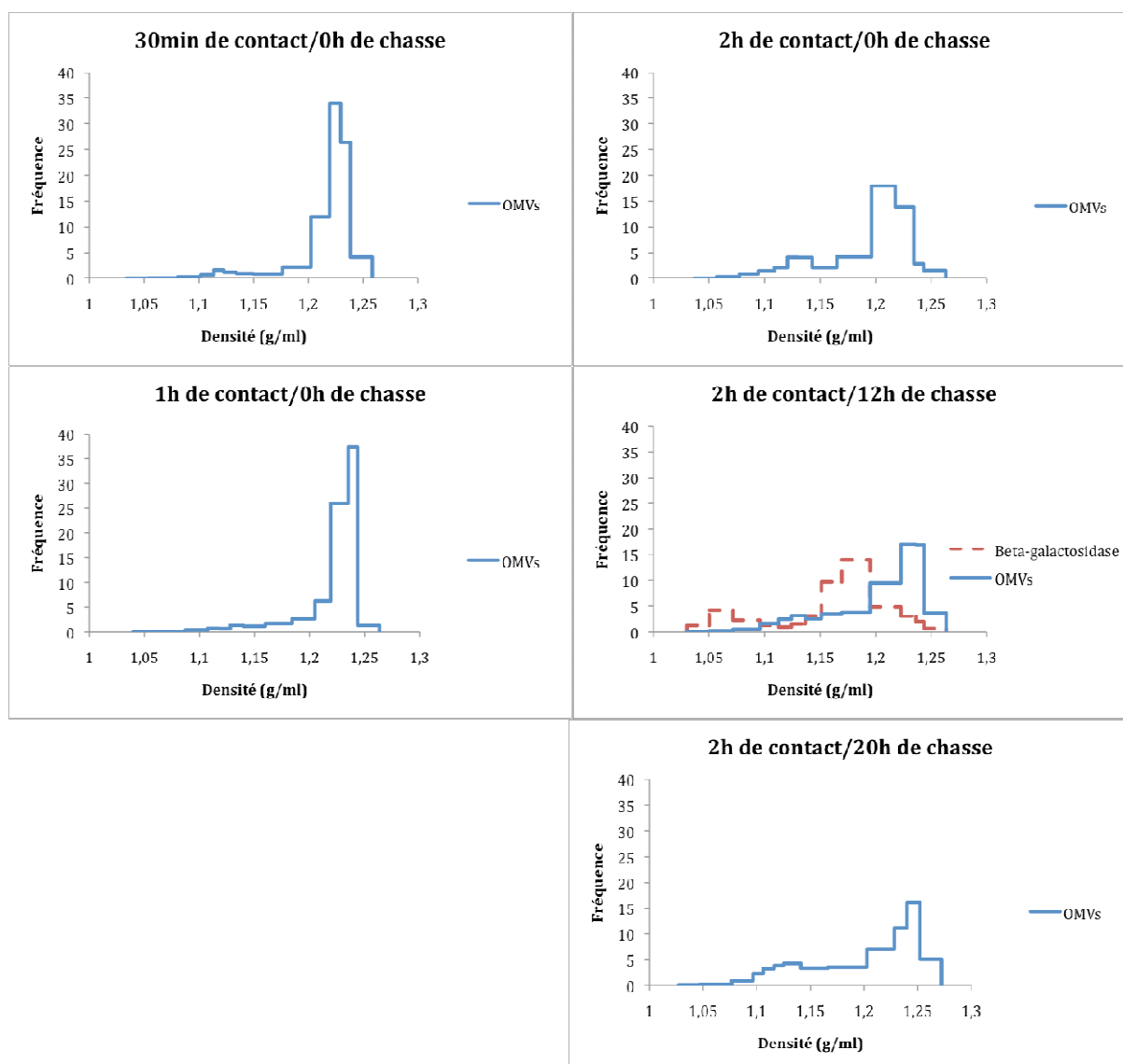


Figure 20 : Distribution intracellulaire des OMVs lyophilisées de *B. abortus* 2308, représentée par des graphes issus de fractionnements subcellulaires par centrifugation isopycnique de Raw 264,7 ayant été incubées avec ces OMVs lyophilisées. Différentes périodes de contact et de chasse sont illustrées. Des Raw 264,7 (2 Pétris) ont été incubées avec des OMVs lyophilisées (20 µg dans 5 ml de milieu) durant des périodes de temps croissantes. Après une série de centrifugations différentielles, les fractions M, L et P ont été rassemblées puis chargées sur gradient de sucrose (1,09 à 1,26 g/cm³). 13 fractions sont récoltées après centrifugation isopycnique du gradient. Le dosage de l'activité β -galactosidase nous a permis d'établir une distribution représentative de cette enzyme dans les fractions (pointillés). Les graphes représentent la distribution des OMVs lyophilisées de *B. abortus* 2308 dans ce gradient de sucrose. La fréquence est exprimée en fonction de la densité des fractions (g/ml). Les OMVs sont détectées dans le fond du gradient de sucrose, qui correspond à des densités élevées.

3. Modifications morphologiques des cellules en présence d'OMVs

Lors des incubations des OMVs sur des cellules Raw 264,7, nous nous sommes aperçus que la morphologie de celles-ci était modifiée. Nous avons alors entrepris une étude en microscopie à contraste de phase afin d'observer plus clairement ces modifications morphologiques (figure 21). Nous avons incubé des OMVs (4µg de protéines/ml de milieu de culture) sur les cellules Raw 264,7 pendant des périodes de temps variables (30 minutes ou 2 heures). Après rinçages des cellules, différents temps de chasse ont été appliqués (de 0 à 20 heures). Une fois les traitements adéquats réalisés, les cellules ont été observées au

microscope à contraste de phase (microscope confocal). Dans la condition « témoin », (cellules incubées sans OMVs), les cellules apparaissent relativement rondes et plates, et leur cytoplasme est assez lisse. Des petits creux correspondent à l'emplacement du noyau. Dès que les cellules sont incubées avec des OMVs, elles semblent s'étaler sur le substrat en formant des prolongements cytoplasmiques, qui sont de plus en plus nombreux au fur et à mesure de l'augmentation du temps de chasse. De plus, il semblerait que la taille des cellules augmente également avec le temps de chasse, alors que la densité de population cellulaire est plutôt affectée négativement ; ceci est particulièrement visible après 20 heures de chasse. Quant au cytoplasme, il semble avoir un aspect plus granuleux au temps de chasse le plus long.

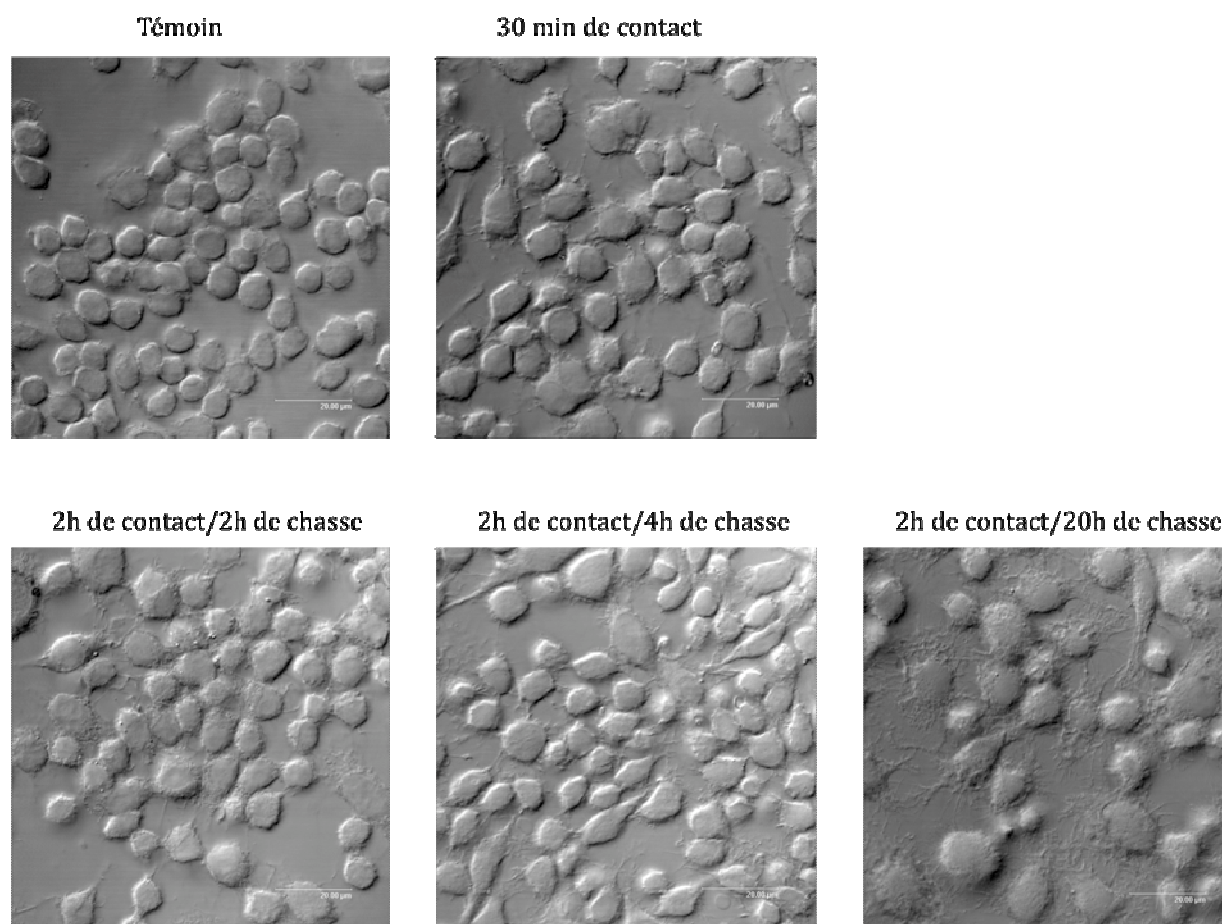


Figure 21 : Evolution de la morphologie des cellules Raw 264,7 lorsqu'elles sont incubées en présence d'OMVs de *B. abortus* 2308. Des cellules Raw 264,7 ont été incubées en présence (4µg de protéines) ou en absence (témoin) d'OMVs de *B. abortus* 2308. Différents temps de contact et de chasse ont été testés, et les cellules ont été observées en microscopie à contraste de phase. Lorsque la période de chasse augmente, les cellules semblent s'étaler sur le substrat en formant de nombreux prolongements cytoplasmiques. De même, la taille des cellules paraît augmenter et le cytoplasme semble devenir plus granuleux. Enfin, la densité de la population cellulaire semble être également affectée négativement lors des temps de chasse les plus longs (la barre d'échelle représente 20 µm).

De toute évidence, les modifications morphologiques des Raw 264,7 incubées avec des OMVs de *Brucella* traduisent une réponse cellulaire dépendante de ce matériel d'origine bactérienne. Un article relate les mêmes modifications morphologiques lorsque des Raw 264,7 sont incubées avec des LPS d'*Escherichia coli* (Saxena et al., 2003). Dans ce papier, la cytométrie de flux confirme l'augmentation de la taille des cellules lorsqu'elles sont en contact avec des LPS d'*E. coli*. Par cette même technique, les auteurs ont également découvert l'apparition de marqueurs de surface de cellules dendritiques en membrane des Raw 264,7 ayant subi une incubation avec des LPS. Bien que les macrophages soient

considérés comme des cellules complètement différenciées, les auteurs n'excluent pas que les Raw 264,7 puissent se différencier en cellules dendritiques présentatrices d'antigènes, lors d'une infection bactérienne localisée. Cependant, des données supplémentaires sont requises pour consolider cette proposition.

Comme les OMVs portent des LPS, nous avons voulu savoir si le changement de morphologie des Raw 264,7 en présence d'OMVs, n'était pas causé, en partie ou totalement, par les LPS. Nous avons donc réalisé la même expérience que précédemment en incubant, toutefois, des LPS purifiés de *B. abortus* 2308 (0,092 mM) envoyés de l'Université de Pamplona (Espagne) par le Pr. I. Moriyon (méthode de purification détaillée dans « Matériel et méthodes » chap. 4.) sur les Raw 264,7 (figure 22). Nous avons essayé, dans la mesure du possible, d'utiliser une quantité de LPS purifiés correspondant à la quantité de LPS amenés par les OMVs, en effectuant une standardisation de la relation entre la concentration protéique et la concentration en LPS dans les OMVs, vu qu'auparavant, les protéines étaient utilisées comme référence de la quantité d'OMVs. Cependant, des fluctuations dans la relation LPS-protéines, en fonction des échantillons, nous conduisent à émettre des réserves quant à la fiabilité de cette relation. Restons donc prudents dans l'interprétation de des résultats car nous ne sommes pas certains d'avoir présenté aux cellules une concentration équivalente d'OMVs (sous forme purifiée, ou sous forme d'OMVs). Le changement de morphologie est moins clair que lorsque les cellules avaient été incubées en présence d'OMVs. Après 30 minutes de contact avec les LPS (0,092 mM correspondant à 4 µl/ml de protéines d'OMVs), les cellules ont une morphologie semblable au témoin, elles sont bien rondes. Toutefois, dans la condition « 2h de contact/4h de chasse », il semblerait qu'il y ait, tout de même, une apparition de quelques prolongements cytoplasmiques. Une augmentation de la taille cellulaire semble apparaître après 20 de heures de chasse. Cependant, une éventuelle diminution de la densité de population cellulaire et l'augmentation de la granulosité du cytoplasme ne sont pas observées sur ces images. Ces résultats mettent en évidence une nette différence entre l'impact des OMVs et des LPS présentés seuls sur la morphologie des cellules Raw 264,7.

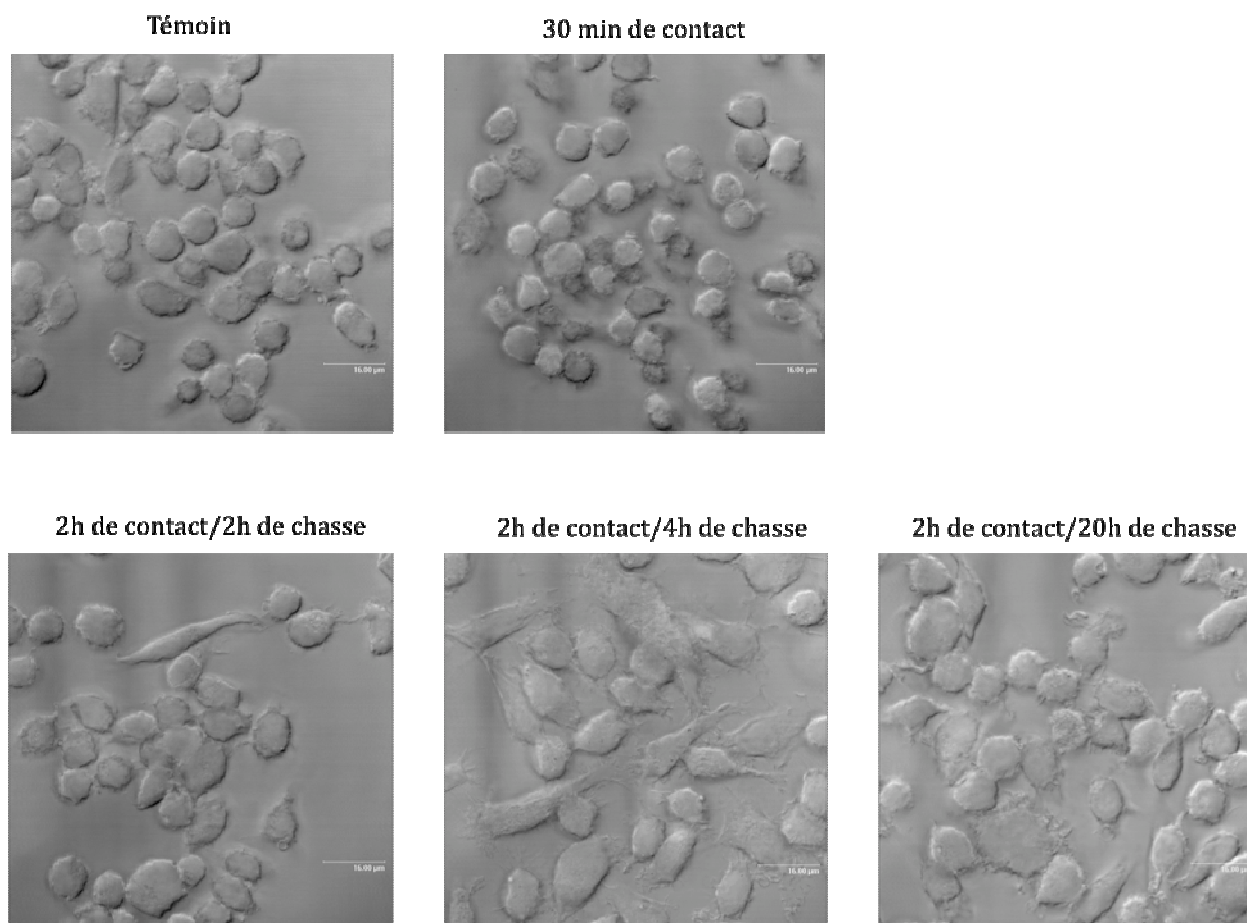


Figure 22 : Evolution de la morphologie des cellules Raw 264,7 lorsqu'elles sont incubées en présence de LPS de *B. abortus* 2308. Des cellules Raw 264,7 ont été incubées en présence (0,092 mM de LPS) ou en absence (témoin) de LPS de *B. abortus* 2308. Différents temps de contact et de chasse ont été testés, et les cellules ont été observées en microscopie à contraste de phase. Après 30 minutes de contact avec les LPS, les cellules ont une morphologie semblable au témoin, elles sont bien rondes. Il semblerait qu'il y ait, tout de même, une apparition de quelques prolongements cytoplasmiques, particulièrement dans la condition « 2h de contact/4h de chasse ». Une augmentation de la taille cellulaire semble apparaître après 20 heures de chasse. Cependant, une éventuelle diminution de la densité de population cellulaire et l'augmentation de la granulosité du cytoplasme ne peuvent pas être observées sur ces images (la barre d'échelle représente 16 µm).

4. Effet des OMVs sur la capture phagocytaire de particules inertes

Afin d'étudier la capture phagocytaire des macrophages Raw 264,7 en présence d'OMVs, nous devons tout d'abord établir une méthode appropriée à cette étude, car aucune expérience de ce type n'avait été réalisée auparavant dans le laboratoire. Nous devons donc choisir des particules inertes qui seraient détectables une fois internalisées par les cellules. Après avoir testé plusieurs types de particules inertes, les billes de latex fluorescentes, ont été choisies comme particules à faire phagocyter par les macrophages Raw 264,7, car elles étaient les seules à fournir des résultats reproductibles. La mesure de la fluorescence reflètera la quantité de billes internalisées dans les cellules.

La première étape fut le test de la capacité des Raw 264,7 à phagocyter ces billes, et ensuite, de choisir la quantité de billes par cellule nécessaire pour que la méthode soit suffisamment sensible. Nous avons donc, d'une part, incubé des Raw 264,7 avec des billes de latex pendant des temps croissants (figure 23A). Nous observons que le signal de fluorescence augmente avec le temps. Un contrôle supplémentaire a cependant été réalisé : la même

expérience a été reproduite, mais à 4°C cette fois, afin de s'assurer que le signal qui était observé représentait bien des billes internalisées dans les Raw 264,7, plutôt que des billes simplement adsorbées sur la membrane plasmique. Aucun signal de fluorescence n'a été détecté dans cette expérience contrôle (résultats non montrés). Ces résultats préliminaires indiquent que les billes de latex fluorescentes semblent être internalisées dans les cellules Raw 264,7. D'autre part, nous avons incubé des quantités croissantes de billes (20, 40, 60 et 80 billes/cellule) avec des macrophages Raw 264,7 durant 2 heures (figure 23B). Les résultats indiquent que le signal de fluorescence augmente avec la quantité de billes par cellule. Nous avons alors décidé de travailler avec le rapport 60 billes/cellules, car le compromis entre la puissance du signal et la consommation de billes nous paraissait raisonnable.

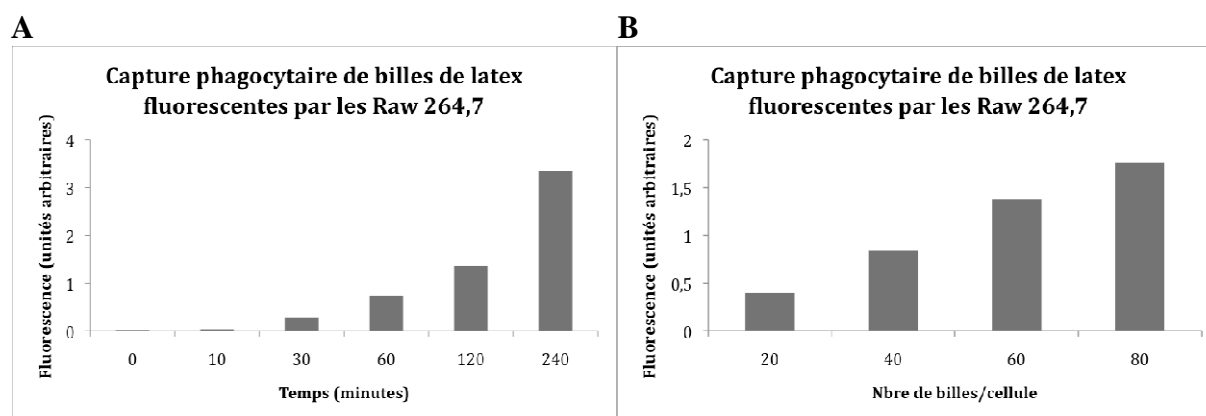


Figure 23 : Mise au point des expériences de capture des billes de latex fluorescentes dans les Raw 264,7. A) Des billes de latex fluorescentes (rapport de 60 billes/cellules) ont été incubées durant les temps indiqués (de 0 à 240 minutes) avec des cellules Raw 264,7. L'axe des y représente le signal de fluorescence mesuré après les lavages des cellules. On constate que le signal de fluorescence augmente avec le temps. B) Différents rapports (20, 40, 60 et 80 billes/cellule) de billes de latex fluorescentes ont été incubés avec des cellules Raw 264,7 durant 2 heures. L'axe des y représente le signal de fluorescence mesuré après les lavages des cellules. Plus la quantité de billes par cellule augmente, plus le signal détecté est important. Nous avons décidé de travailler avec le rapport 60 billes/cellules, car le compromis entre la puissance du signal et la consommation de billes nous paraissait raisonnable.

Ensuite, il nous fallait trouver une façon de normaliser les résultats que nous allions obtenir, afin de rectifier la variabilité due aux différences du nombre de cellules présentes dans chacun des puits. Nous avons choisi de réaliser un dosage de l'activité de l'enzyme lysosomale β -galactosidase après chaque expérience. Ce dosage, très pratiqué dans le laboratoire, et qui est tout à fait adapté aux macrophages que nous utilisons, nous a donc permis de corriger les valeurs obtenues en fluorescence, et de comparer les résultats d'un puits à l'autre mais aussi d'une expérience à l'autre. La figure 24 illustre une expérience contrôle où différentes densités cellulaires de Raw 264,7 ont étéensemencées en plaque 24 puits, et sur lesquelles un dosage de l'activité de la β -galactosidase a été pratiqué. Le signal de fluorescence mesuré est en relation avec la quantité de cellules des différentes conditions testées.

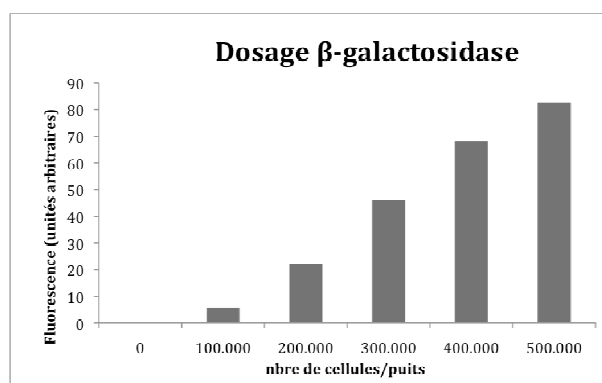


Figure 24 : Mise au point du dosage β -galactosidase pour la normalisation des résultats issus des mesures de capture phagocytaire. Différentes quantités de cellules ont étéensemencées en plaque 24 puits, et un dosage de l'activité β -galactosidase a été réalisé. La fluorescence est exprimée sur l'axe y de ce graphe. Le signal de fluorescence est relatif à la quantité de cellules.

Il est important de signaler que pour les expériences de mesures de capture phagocytaire, les OMVs n'ont pas subi l'étape de centrifugation sous gradient d'Optiprep, étape destinée à améliorer la purification des OMVs en éliminant les contaminants résiduels. Une quantité importante de matériel était nécessaire pour cette étude et la multiplication de la manipulation des OMVs amène à la perte de matériel, c'est pourquoi nous avons décidé de passer outre cette étape. Nous avons donc incubé des billes de latex fluorescentes (60 billes/cellules) et des OMVs de *B. abortus* 2308, à raison de différentes concentrations (10, 20 et 40 μ g de protéines/ml de milieu de culture), sur les cellules murines Raw 264,7 durant 2 heures. La fluorescence (reflétant la quantité de billes internalisées) a été ensuite mesurée après les rinçages adéquats puis, le dosage de l'activité β -galactosidase a été effectué. Après la normalisation des résultats obtenus, nous constatons que les cellules qui ont été incubées en présence d'OMVs voient leur capacité de phagocyter les billes, affectée négativement, par rapport au témoin (figure 25). Cette diminution de la capture phagocytaire est significative pour la condition « 20 μ g d'OMVs », et très significative pour la condition « 40 μ g d'OMVs ». En conclusion, les OMVs, ou du moins certains composants des OMVs, semblent avoir un effet non négligeable sur la capacité des macrophages murins Raw 264,7 à phagocyter des particules inertes.

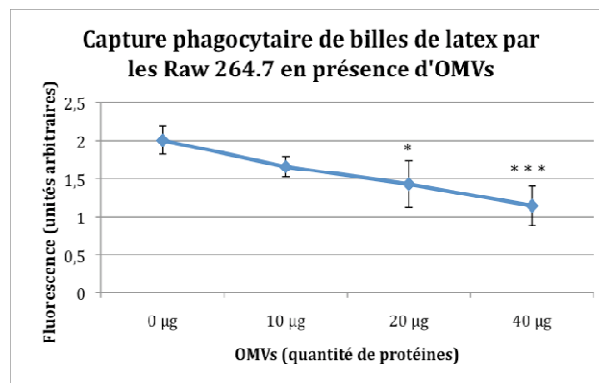


Figure 25 : Mesures de la capacité phagocytaire des Raw 264,7 en présence ou en absence d'OMVs produits par *B. abortus* 2308. Des billes de latex fluorescentes (60 billes/ cellules) et des OMVs de *B. abortus* 2308 (10 µg, 20 µg et 40 µg de protéines) ont été incubées sur des macrophages Raw 264,7 pendant 2 heures. La fluorescence reflète la quantité de billes internalisées dans les cellules. Ce graphe illustre le pourcentage de fluorescence sur l'axe des y, et les concentrations d'OMVs testées sur l'axe des x. Pour l'analyse statistique, une ANOVA 1, suivie d'une analyse de Bonferroni ont été réalisées⁹. Pour la condition 10 µg, on observe une tendance à la diminution de la capacité phagocytaire (P: 0,16), alors que cette diminution est significative pour la condition « 20 µg » (P: 0,011) et très significative pour la condition « 40 µg » (P: 0,0006). (n=4).

Cependant, il nous paraît important de signaler que la quantité d'OMVs que nous utilisons lors des incubations ne correspond pas aux conditions retrouvées in vivo, lors d'une infection par *Brucella*. En effet, « 10 µg d'OMVs/ml » correspond à la production d'OMVs d'environ 2.10^5 bactéries, ce qui semble un nombre important sachant que lors d'infections cellulaires on utilise 300 bactéries par cellule (ce qui est déjà considéré comme très élevé). Nous ne sommes donc clairement pas dans des doses physiologiques.

⁹ **Statistiques** (en collaboration avec B. De Hertogh) : Nous observons une diminution du signal moyen de fluorescence (qui reflète le taux de phagocytose) lorsque les cellules sont au contact d'OMVs. Aussi, nous pouvons constater une relative homogénéité des variances.

	0 µg	10 µg	20 µg	40 µg
n	4	4	4	4
Moyennes	2,003	1,655	1,427	1,140
Variances	0,034	0,0112	0,094	0,068

Après normalisation des données, et vérification de l'homogénéité des variances, nous avons procédé à une analyse ANOVA 1. Celle-ci est statistiquement significative (**), ce qui signifie qu'au moins une des populations est différente d'au moins une des autres.

	SCE	dl	CM	F	Probabilité
Totale	2,221	15			
Facteur	1,599	3	0,533	10,275	0,001
Régression linéaire	1,523	1	1,523	29,370	0
Ecarts à la linéarité	0,075	2	0,038	0,728	0,503
Résiduelle	0,622	12	0,052		

Un test multiple de Bonferroni, spécifique de la comparaison entre population test et contrôle, a mis en évidence une diminution significative de la capture phagocytaire pour la condition « 20 µg » (*) et « 40 µg » (***). La tendance à la diminution de capture phagocytaire pour la condition « 10 µg » n'est pas significative.

vs	10 µg	20 µg	40 µg
0 µg	0,156	0,011	0,0006

Comme les LPS semblent être un des composant majeur des OMVs, nous avons voulu voir si l'effet des OMVs sur les cellules ne serait pas du, totalement ou en partie, aux LPS. Nous avons donc reproduit l'expérience en incubant des LPS purifiés de *B. abortus* 2308 sur les cellules Raw 264,7 pendant 2 heures (figure 26). De la même manière que précédemment, (« Résultats et discussion » chap.3.), nous avons essayé d'utiliser une quantité de LPS purifiés qui corresponde le plus possible à la quantité de LPS amenée par les OMVs. Nous avons donc incubé des billes de latex fluorescentes (60 billes/cellules) et des LPS de *B. abortus* 2308, à raison de différentes concentrations (0,115 mM et 0,230 mM correspondant à 10 µg et 20 µg de protéines), sur les cellules murines Raw 264,7 durant 2 heures. La fluorescence a été ensuite mesurée après les rinçages adéquats puis, le dosage de l'activité β -galactosidase est effectué. Après la normalisation des résultats obtenus, nous constatons que les cellules qui ont été incubées en présence de LPS voient leur capacité de phagocyter des billes de latex diminuée. Nous ne pouvons donc pas écarter que la diminution de capacité phagocytaire des Raw 264,7 lorsqu'elles ont été en contact avec des OMVs, soit le résultat, au moins en partie, de l'action des LPS, avec toutefois la réserve due au fait que nous n'avons pas la garantie d'avoir présenté aux cellules, la même quantité de LPS (sous forme libre ou sous forme d'OMVs).

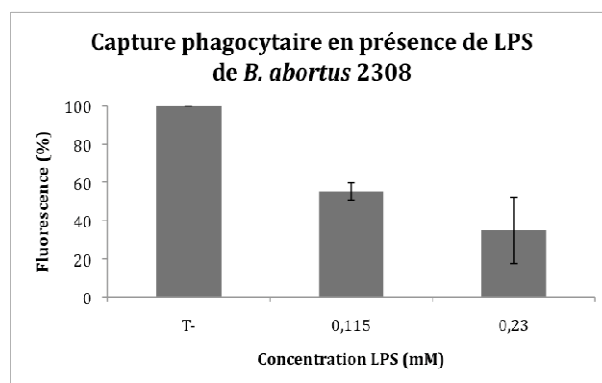


Figure 26 : Mesures de la capacité phagocytaire des Raw 264,7 en présence ou en absence de LPS de *B. abortus* 2308. Des billes de latex fluorescentes (60 billes/ cellules) et des LPS de *B. abortus* 2308 (0,115 mM et 0,230 mM) ont été incubés sur des macrophages Raw 264,7 pendant 2 heures. Ce graphe illustre le pourcentage de fluorescence sur l'axe des y, et les concentrations en LPS testées sur l'axe des x. Il semble que les LPS ont une tendance à diminuer la capacité phagocytaire des macrophages. Cette expérience n'a été reproduite que 2 fois, ce qui ne nous permet pas de faire une analyse statistique.

5. Influence des OMVs sur le trafic intracellulaire de particules inertes

Il a été récemment mis en évidence que les OMVs produites par *L. pneumophila* ont la capacité de dévier le trafic de particules inertes en inhibant la fusion phago-lysosomale (Fernandez-Moreira et al., 2006). Celles-ci ont la capacité d'inhiber la fusion entre le phagosome, contenant *Legionella*, et les lysosomes, ce qui permet aux bactéries de rejoindre la niche répliative, sans se faire dégrader. Bien que nous ayons connaissance de la fusion de la BCV contenant *Brucella* avec les lysosomes (Starr et al., 2008), nous posons l'hypothèse que les OMVs de *Brucella* pourraient avoir également un rôle dans le trafic intracellulaire de la bactérie, ce qui l'autoriserait à rejoindre le brucellosome où elle établit sa niche de réplication. Afin d'étudier l'impact éventuel des OMVs sur le trafic intracellulaire de matériel, les mêmes billes de latex fluorescentes (1 µm de diamètre) que dans l'expérience précédente ont été choisies comme particules inertes à faire phagocyter par les macrophages Raw 264,7.

Pour étudier l'impact éventuel des OMVs sur le trafic intracellulaire de particules inertes, il nous fallait voir dans quelle mesure nous pourrions évaluer la distribution des billes dans les Raw 264,7. Par centrifugations différentielles, nous avons tenté d'observer l'arrivée des billes de latex aux lysosomes. L'objectif étant de comparer cette cinétique avec celle réalisée en présence d'OMVs. Les contrôles décrits dans la figure 14 sont valables également pour ce volet du mémoire. Nous avons donc incubé des billes de latex (60 billes/cellule) (figure 23B) sur des cellules Raw 264,7 durant 1 heure. Après ce temps d'incubation, les cellules ont subi un rinçage, afin d'éliminer les billes résiduelles, puis des périodes de temps de chasse croissantes ont été appliquées avant la récolte des cellules et le fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle. Les graphiques (figure 27A) représentent l'activité (pour les enzymes) ou la fluorescence (pour les billes) spécifique relative (ASR ou FSR) en fonction du pourcentage de protéines. Les résultats semblent indiquer qu'une quantité croissante de billes se retrouve dans la fraction N quand le temps de chasse augmente (figure 27A et 27B). L'activité lysosomale, estimée par la mesure de l'activité β -galactosidase, semble emprunter la même progression vers la fraction N (figure 27A et 27B). Une possibilité serait que les billes de latex entraînaient une délocalisation d'une fraction des hydrolases lysosomales vers la fraction N. Cependant, cette possibilité ne repose que sur le résultat obtenu lors d'une expérience unique et par conséquent, l'expérience aurait dû être reproduite, et des expériences complémentaires auraient dû être réalisées en appliquant des temps de chasse plus longs. Malgré tout, la réalisation de temps de chasse supérieurs à 48 heures semble compliqué, vu la prolifération rapide des cellules Raw 264,7. Hormis leur tendance à s'accumuler dans la fraction N après de longs temps de chasse, les billes présentent une distribution intracellulaire relativement constante au fil du temps.

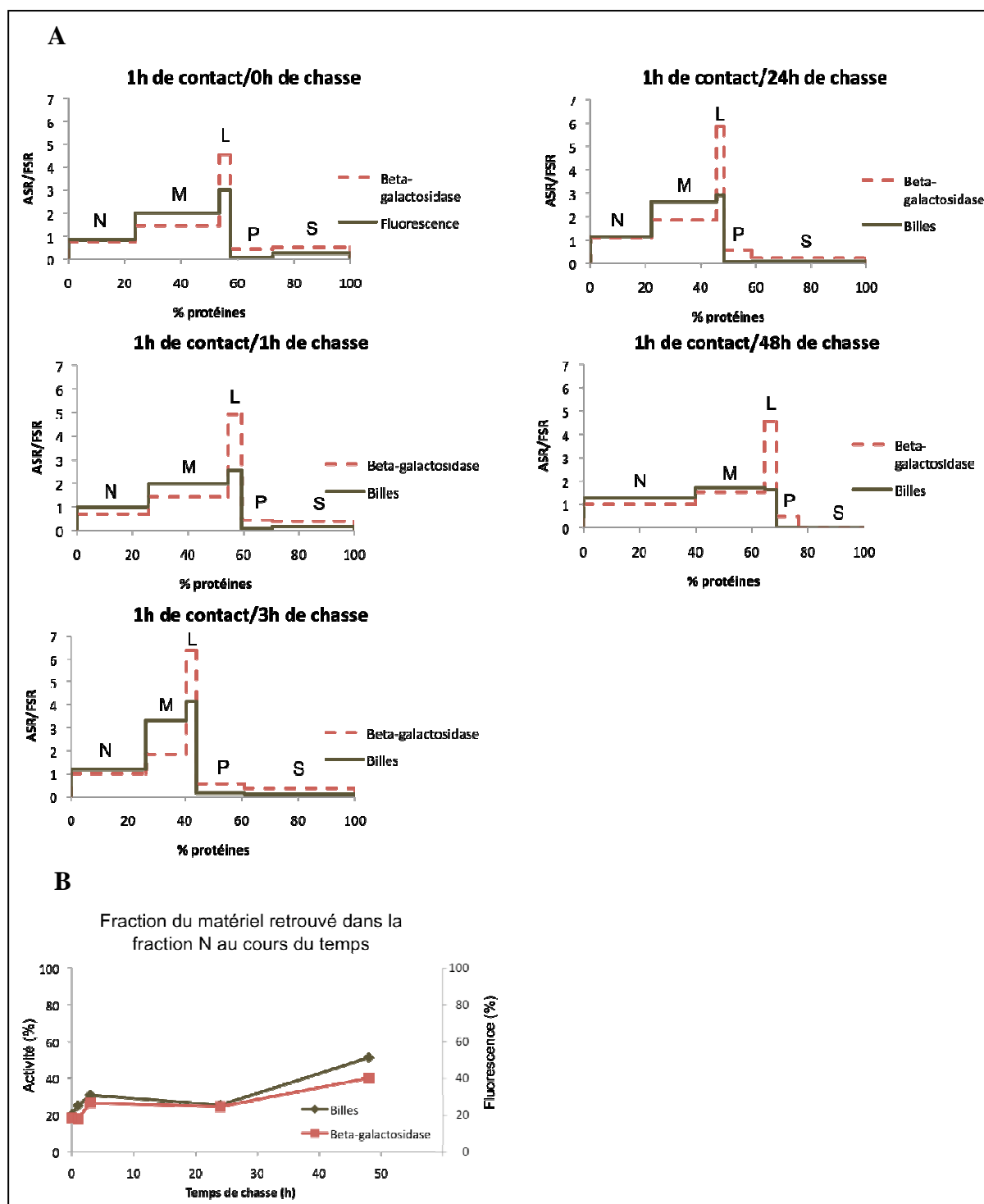


Figure 27 : Distribution intracellulaire des billes de latex fluorescentes, représentée par des graphes issus de fractionnements cellulaires de Raw 264,7 ayant phagocyté ces particules inertes. Différentes périodes de contact et de chasse sont illustrées. Les Raw 264,7 ont été incubées en présence de billes de latex fluorescentes durant 1 heure. Après un rinçage, des temps de chasse croissants ont été appliqués. Les cellules ont ensuite subi une série de centrifugations différentielles permettant l'isolation des fractions N, M, L, P et S. A) Les graphes représentent la présence des billes de latex dans les 5 fractions obtenues à la fin des centrifugations différentielles. L'activité ou la fluorescence spécifique relative (ASR pour les enzymes et FSR pour les billes, définie par le pourcentage d'activité/fluorescence d'une fraction, divisé par le pourcentage de protéines dans la fraction correspondante) est exprimée en fonction du pourcentage de protéines. Il semble que les billes soient principalement présentes dans la fraction M, et qu'une plus grande quantité de billes est détectée dans la fraction N au fur et à mesure que la durée des temps de chasse augmente. L'activité β -galactosidase semble mener la même progression vers la fraction N. B) Evolution de la présence des billes de latex et de l'activité β -galactosidase vers la fraction N au cours du temps.

Parallèlement, nous avons fait deux expériences contrôles. La première était la réalisation d'une centrifugation de billes seules, en appliquant le même protocole de centrifugations différentielles. Cela nous a permis d'évaluer les propriétés intrinsèques de sédimentation de ce type de particules inertes, qui sont principalement retrouvées dans la fraction M (figure 28A). La deuxième expérience contrôle consistait en l'addition des billes après l'homogénéisation des cellules Raw 264,7. Ce test était destiné à distinguer si les billes étaient internalisées ou si elles étaient simplement adsorbées sur la surface cytosolique des membranes des organites, auxquelles les billes ont accès après le processus d'homogénéisation (figure 28B). Un profil de distribution des billes semblable est obtenu. L'activité de l'enzyme lysosomale β -galactosidase a été dosée à partir des fractions obtenues. Une majorité de l'activité est détectée dans la fraction M. Ces résultats nous indiquent que les caractéristiques intrinsèques des billes entraînent leur sédimentation dans la fraction M, après application d'un protocole de centrifugations différentielles.

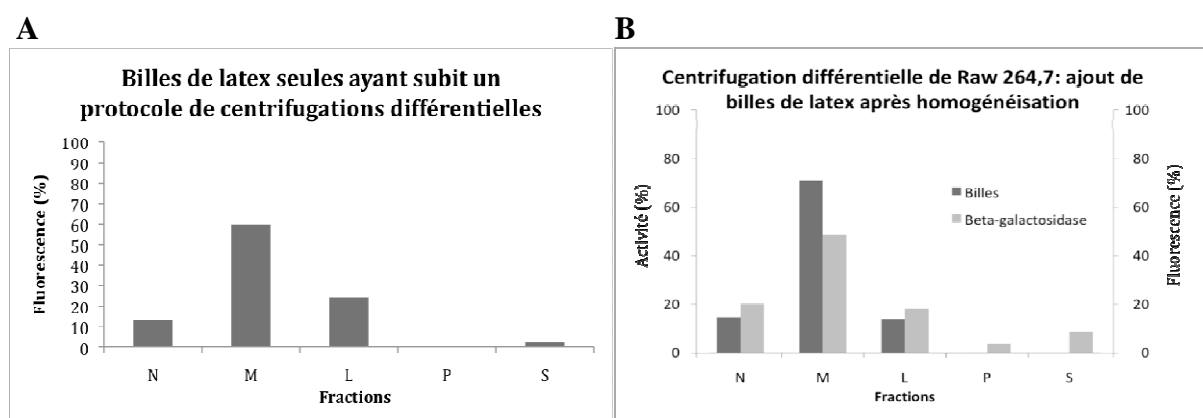


Figure 28 : Expériences contrôles dans le cadre de l'étude de la distribution des billes de latex fluorescentes dans les Raw 264,7 après application du protocole de centrifugations différentielles. A) Centrifugation de billes seules, en appliquant le même protocole de centrifugations différentielles. Le graphe représente le profil de sédimentation intrinsèque des billes de latex après avoir subi un protocole de centrifugations différentielles. Le graphe représente la fluorescence (%) détectée dans les différentes fractions obtenues. La fluorescence est principalement détectée dans la fraction M (59,84%). B) Centrifugations différentielles d'un homogénat de Raw 264,7 auquel des billes ont été ajoutées à posteriori. Ce graphe représente l'activité β -galactosidase (gris clair) et la fluorescence des billes (gris foncé), détectées dans les fractions obtenues après les étapes de centrifugations différentielles. 48,9% d'activité β -galactosidase est mesurée dans la fraction M.

Il semble que le matériel non phagocyté ait une distribution semblable à celle observée lorsque les Raw 264,7 ont été incubées avec les billes (figure 27). En effet, ces billes sont principalement présentes dans la fraction M dans les deux cas (figures 27 et 28). Cela suggère une expérience de vérification de l'internalisation des billes de latex par les cellules Raw 264,7, en microscopie confocale par exemple.

Ensuite, nous avons décidé d'utiliser une technique complémentaire de la centrifugation différentielle, à savoir la centrifugation isopycnique sur gradient de sucrose. Nous avons réalisé 4 conditions différentes, parmi lesquelles des contrôles (figure 29). La première condition correspond à un lysat de Raw 264,7 seules. La deuxième condition est un homogénat de Raw 264,7 auquel des billes de latex ont été ajoutées à posteriori. La troisième condition représente des billes de latex seules et la quatrième condition correspond à des Raw 264,7 incubées avec des billes durant 2h. Chacune des conditions s'est vue appliquer le protocole de centrifugation isopycnique. La troisième condition nous a permis d'évaluer les propriétés intrinsèques d'équilibration des billes dans le gradient. Chacune des charges a été déposée au dessus du gradient. Les graphes indiquent que la distribution des billes dans les

différentes conditions testées est similaire (figure 29). Dans le cas où des hydrolases auraient rejoint les compartiments contenant les billes, les profils de β -galactosidase pourraient nous aider à mettre en évidence un changement de l'équilibration de la β -galactosidase à des densités plus faibles, correspondant aux densités auxquelles s'équilibrent les billes. Cependant, les profils de β -galactosidase semblent être identiques pour toutes les conditions testées. Ces profils suivent une distribution bimodale, pour laquelle le premier pic (densité : 1,21 g/ml) représente des lysosomes qui se sont équilibrés à leur propre densité, et où le second pic (densité : 1,1 g/ml) pourrait correspondre à des enzymes lysosomales qui se trouvent hors des organelles, et qui restent donc au dessus du gradient. Vu que l'activité β -galactosidase soluble et la fluorescence des billes sont détectées aux mêmes densités, il nous est impossible de détecter une éventuelle association entre les billes et les lysosomes avec ce type de méthode. En effet, cette éventuelle association concerne une très faible quantité de l'activité β -galactosidase.

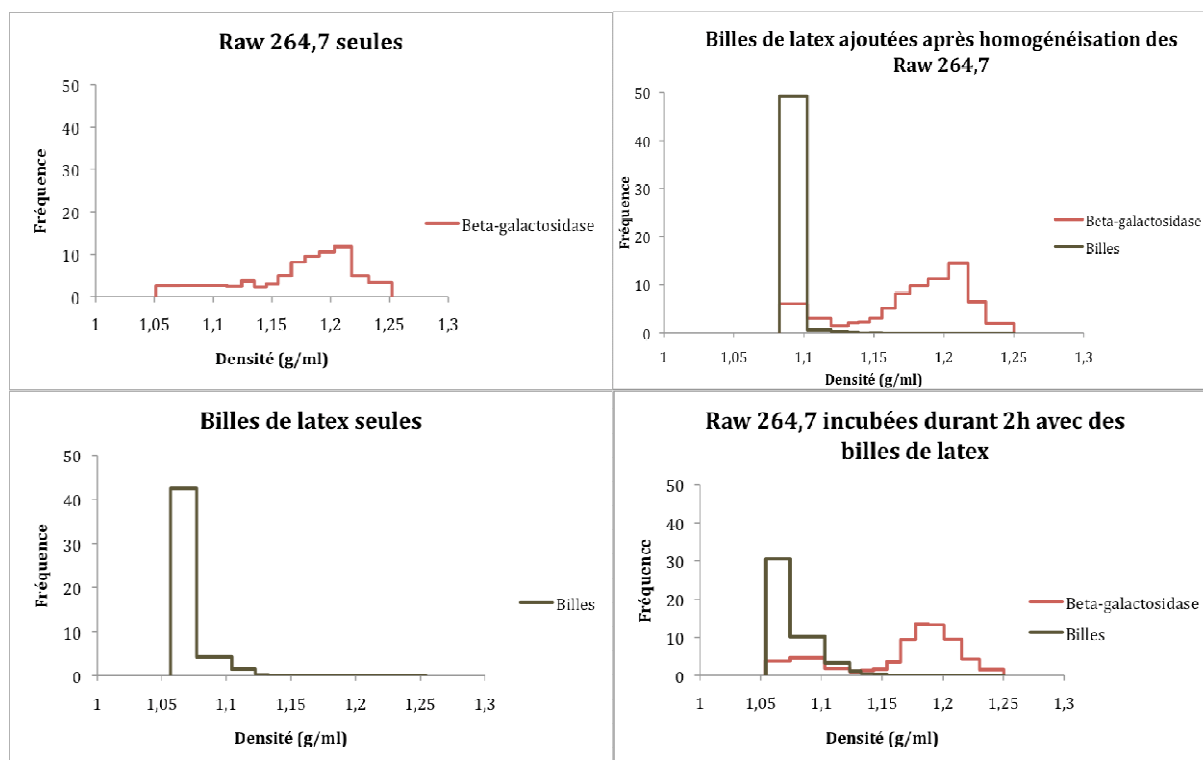


Figure 29 : Analyse de la distribution des billes de latex dans les cellules Raw 264,7 par la méthode de centrifugation isopycnique, les charges sont déposées en haut du gradient de densité de sucrose (1,09 à 1,26 g/ml). En haut à gauche, la charge déposée sur le gradient est un homogénat de Raw 264,7. En haut à droite, la charge représente un homogénat de Raw 264,7 auquel des billes de latex ont été ajoutées. En bas à gauche, seules des billes de latex ont été chargées sur le gradient. En bas à droite, des cellules Raw 264,7 ont été incubées durant 2 heures avec des billes de latex avant d'être déposée sur le gradient. Après homogénéisation, l'échantillon a été chargé sur le gradient. La fluorescence et l'activité β -galactosidase ont été mesurées à partir des fractions isolées du gradient de sucrose. Les billes de latex sont, à chaque fois, détectées dans le haut du gradient. L'activité β -galactosidase suit une distribution bimodale pour tous les gradients.

Nous avons donc décidé de réaliser la même expérience avec des fractions MLP rassemblées et chargées en dessous (et non plus au dessus) du gradient de sucrose. Par cette technique, les enzymes lysosomales libres subsistent dans le fond du gradient, après centrifugation. Cette méthode pourrait nous aider à découvrir si un faible pourcentage de la β -galactosidase s'équilibre aux mêmes densités faibles que les billes de latex, ce qui démontrerait la présence d'hydrolases dans les compartiments contenant les billes. Dans ce cas, nous aurions dû détecter une activité β -galactosidase dans le haut du gradient. Nos

résultats (figure 30) indiquent qu'environ 24 % de l'activité β -galactosidase est soluble (et donc détectée dans le fond du gradient de sucrose). Cela signifie que beaucoup de lysosomes ont été endommagés soit, à cause de la pression trop élevée qui est exercée dans le fond du gradient pendant la centrifugation, soit, à cause d'un choc hypertonique qui a eu lieu au moment de l'ajustement de la densité des échantillons. Les billes, quant à elles, sont à nouveau présentes dans le haut du gradient et ne semblent pas influencer la distribution des lysosomes, vu qu'une majorité de l'activité β -galactosidase est mesurée dans des fractions correspondant à des densités plus élevées. Nous n'avons donc pas pu identifier la présence de billes dans les lysosomes par cette méthode. Il est possible qu'une telle proportion (24%) de lysosomes endommagés amène un biais dans l'interprétation des résultats. De plus, nous ne pouvons pas exclure que les lysosomes contiennent des billes après des temps supérieurs à 2 heures. Aussi, il se pourrait que la proportion de billes associées aux hydrolases lysosomales soit tellement faible, qu'elle ne soit pas détectable.

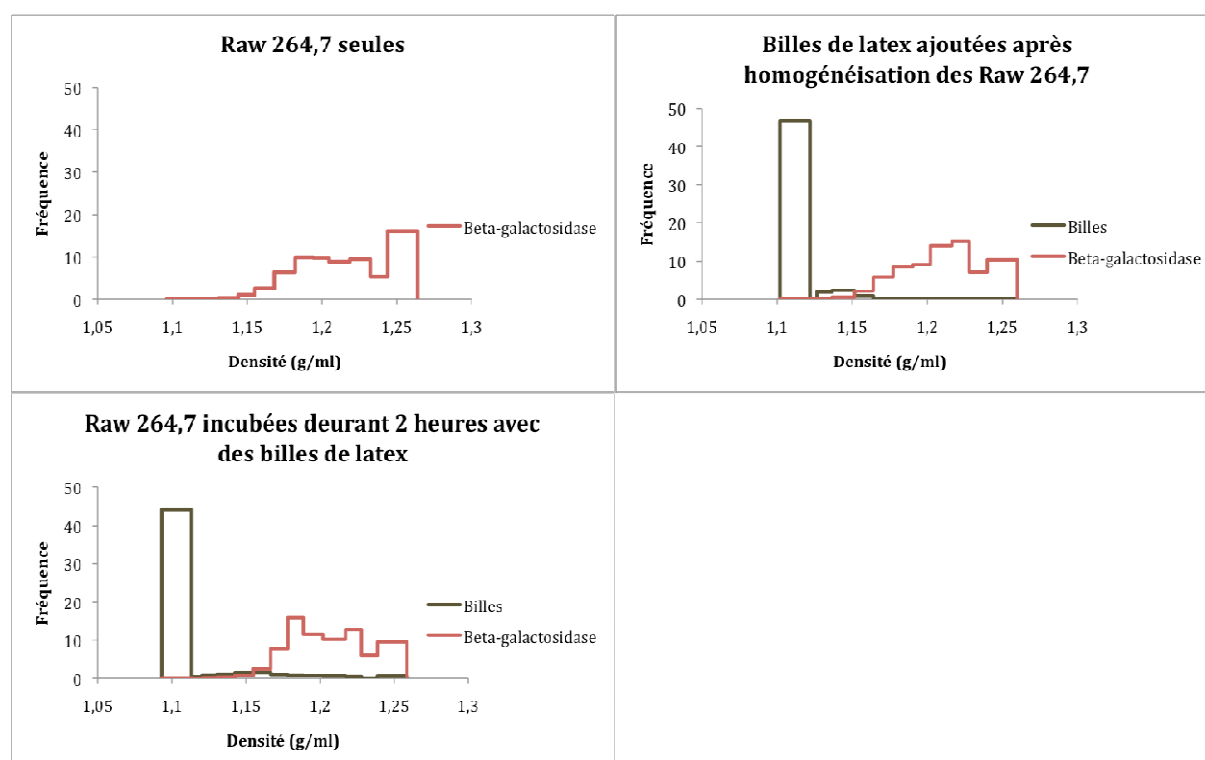


Figure 30 : Analyse de la distribution des billes de latex dans les cellules Raw 264,7 par la méthode de centrifugation isopycnique, les charges sont déposées dans le fond du gradient de densité continu de sucrose (1,09 à 1,26 g/ml). En haut à gauche, la charge du gradient est un homogénat de Raw 264,7. En haut à droite, la charge représente un homogénat de Raw 264,7 auquel des billes de latex ont été ajoutées. En bas à gauche, des cellules Raw 264,7 ont été incubées durant 2 heures avec des billes de latex. Après homogénéisation, les échantillons des différentes conditions ont été chargés sous le gradient. La fluorescence et l'activité β -galactosidase ont été mesurées à partir des fractions isolées du gradient de sucrose. De la même façon que dans la figure 24, les billes de latex sont détectées dans le haut du gradient. En moyenne, 24% de l'activité β -galactosidase est détectée dans le fond du gradient, ce qui est la représentation possible de matériel libéré à partir de lysosomes endommagés. Aucune association visible des billes avec la β -galactosidase n'est détectable par cette technique.

Conclusions et perspectives

À l'aube de ce travail, très peu d'informations sont disponibles au sujet OMVs produites par *Brucella* spp., et spécialement concernant leurs fonctions physiologiques.

Les vésicules de membrane externe (OMVs) sont produites par une grande variété de bactéries à Gram négatif. La communauté scientifique s'intéresse depuis peu à leurs rôles possibles de « comunicasomes » intercellulaires qui autoriseraient l'établissement d'interactions avec d'autres bactéries de la même espèce ou non, mais également avec des cellules eucaryotes.

Tout d'abord, nous avons établi un protocole de purification d'OMVs. Une culture de *B. abortus* 2308 (1,6 l) est centrifugée, puis stérilisée par filtration sur un filtre 0,22 µm, avant d'être concentrée 500 fois par filtration tangentielle. Les 1,5 ml récoltés, et enrichis en OMVs, sont déposés sous un gradient d'Optiprep. Lors de la centrifugation, l'enrichissement en OMVs se fait par remontée de ceux-ci dans le gradient, et par élimination des contaminants qui restent dans le fond du gradient. Après cette étape, le gradient est coupé en 8 fractions identiques, et les fractions 1 à 6, contenant le matériel qui a flotté dans le gradient, sont récupérées. Celles-ci subissent une nouvelle ultracentrifugation. Le culot, enrichi en OMVs subi finalement, une filtration stérilisante. En réalisant une caractérisation initiale des échantillons, nous avons eu l'indication que du matériel membranaire était obtenu. En effet, des LPS, et plusieurs Omps ont pu être détectés par des techniques d'immunomarquage. Notons qu'une hétérogénéité des OMVs est constatée. Premièrement, des analyses de ce matériel en microscopie électronique à transmission révèlent des différences morphologiques, car nous observons des vésicules de taille variable, ainsi que des fragments membranaires. Deuxièmement, nous constatons que les protéines de membrane externe Omp 16 et Omp 19 se retrouvent sur des structures qui s'équilibrent à des densités plus faibles (1,11 à 1,14 g/cm³) que celles qui portent Omp 25, Omp 36/38 et Omp 89 (1,14 à 1,16 g/cm³) dans le gradient d'Optiprep, ce qui suggère peut-être l'existence de plusieurs populations d'OMVs. Cette hétérogénéité présente un intérêt analytique. En effet, nous pourrions envisager d'étudier les effets, potentiellement différents, des différentes populations supposées d'OMVs.

Nous avons mis au point ce protocole pour travailler avec du matériel frais. Malheureusement, la quantité d'OMVs (100 µg de protéines) recueillie chaque semaine restait très faible, ce qui fut, souvent, un facteur limitant pour la réalisation de nos expériences. De plus, une production d'une quantité plus importante de matériel était difficilement possible au vu des risques d'accidents accrus qui découlent de l'augmentation de la quantité de culture.

Notons qu'une piste, qui nous permettrait d'outrepasser cette difficulté, serait de cultiver *Brucella* en milieu acide, étant donné que ce type de culture a été décrit comme aboutissant à une surproduction d'OMVs chez *B. Suis* (Boigegrain et al., 2004). Dans le cas où une augmentation de la production serait également constatée chez *B. abortus*, la culture en milieu acide pourrait être reproduite chaque semaine pour générer une plus grande quantité de matériel. Notons qu'une modification du milieu de culture pourrait aboutir à la production d'un matériel différent.

Aussi, une caractérisation plus approfondie des OMVs serait nécessaire. Nous pourrions envisager, d'une part, une analyse protéomique du matériel, par spectrométrie de masse. Cette technique nous permettrait de réaliser l'identification de toutes les protéines composant les OMVs de *B. abortus* 2308. D'autre part, l'analyse des OMVs en microscopie électronique doit être reproduite et approfondie, afin, notamment, de préciser la taille moyenne des OMVs.

Suite à la mise au point du protocole de purification des OMVs, nous avons tenté d'aborder l'étude de leur endocytose et de leur destin intracellulaire. Nous avons commencé

par démontrer, en utilisant la technique de microscopie confocale, que les OMVs étaient internalisées dans les macrophages Raw 264,7. Ensuite, la mise au point de la méthode de fractionnement subcellulaire de cellules Raw 264,7 a été réalisée. Une série de centrifugations différentielles nous a permis d'obtenir les fractions E, N, M, L, P et S. Les fractions M, L et P ont ensuite été rassemblées et déposées sur gradient de densité de sucrose (1,09 à 1,26 g/ml) avant de subir une centrifugation isopycnique autorisant la flottation du matériel déposé à sa propre densité. Ce protocole, appliqué aux cellules Raw 264,7 ayant été incubées pendant différentes périodes de contact et différentes périodes de chasse avec des OMVs, nous a permis de constater une évolution de la distribution intracellulaire des OMVs au fil du temps. En effet, celles-ci s'équilibrent à des densités de sucrose de plus en plus faibles lorsque le temps de chasse augmente. Cette observation est une nouvelle indication de l'internalisation des OMVs par les macrophages Raw 264,7. Cependant, nos résultats ne nous ont pas permis de conclure à la résidence des OMVs dans des compartiments subcellulaires déterminés. De plus, aucune localisation des OMVs dans les lysosomes n'a pu être établie, même après 20 heures de chasse, ce qui semble assez surprenant. Nous pouvons postuler, premièrement, que des composants des OMVs puissent retarder l'arrivée du matériel endocyté aux lysosomes, qui a normalement lieu plus rapidement. Deuxièmement, nous ne pouvons pas exclure que les OMVs transitent bien par les lysosomes, mais que nous n'ayons pas pu identifier cette association, à cause des temps de chasse trop espacés. Et enfin, nous aurions pu imaginer que les OMVs présents dans les lysosomes y soient dégradés directement, mais cette hypothèse est peu probable étant donné que les LPS de *Brucella* sont décrits comme étant résistants à la dégradation dans les lysosomes (Forestier et al., 1999), et que nous n'avons pas constaté de diminution du signal LPS au cours du temps. Rappelons aussi qu'une détection des OMVs par Omp 25 a été réalisée, et qu'elle montrait des profils de distribution identiques aux profils obtenus par la détection des LPS. Afin de pouvoir tirer des conclusions pertinentes de cette étude, nous sommes conscients que nous devons reproduire ces résultats.

D'autre part, une étude en microscopie confocale, par l'utilisation d'anticorps dirigés contre des marqueurs des phagosomes ou des endosomes, pourrait nous fournir des indications relatives à la distribution des OMVs dans la cellule. Cependant, ce type de travail sera difficilement applicable aux cellules Raw 264,7, étant donné que leur cytoplasme est relativement petit, ce qui ne facilite pas la distinction des compartiments cellulaires.

Comme *Brucella* infecte également les cellules épithéliales (Shepard, 1958), il serait intéressant de réaliser une étude de l'endocytose des OMVs dans ce type de cellules. Aussi, une analyse en microscopie confocale serait, sans doute, plus facile à mettre en place dans des cellules de type HeLa par exemple, plutôt que dans les cellules Raw 264,7.

Dans le même registre, la collaboration avec le laboratoire du Pr. Moriyon (Université de Pamplona, Espagne) nous a conduit à tester des OMVs qui sont produites dans leur laboratoire et qui nous ont été envoyées sous forme lyophilisée. De façon surprenante, nous observons des profils de distribution intracellulaire de ces OMVs totalement différents de ceux obtenus avec les OMVs produites aux FUNDP. En effet, les OMVs lyophilisées ont été détectés dans des zones de densités les plus élevées du gradient de sucrose, pour tous les temps de chasse testés. Ces résultats mettent en évidence une différence de comportement importante entre les deux types d'OMVs dans les macrophages. Cette différence pourrait être liée à la difficulté que nous avons éprouvée de solubiliser les OMVs lyophilisées, qui, par conséquent, se comportent comme des agrégats. Par conséquent, cette aggrégation pourrait avoir un effet sur leur destin intracellulaire, après phagocytose. Aussi, la différence de profil de distribution pourrait être causée par la méthode de purification des deux types d'OMVs, qui diffère quelque peu (« Matériel et méthode chap. 3. »).

Enfin, une expérience complémentaire, dans laquelle des OMVs lyophilisées sont ajoutées à un homogénat de Raw 264,7, aurait pu nous aider à faire une distinction entre des OMVs internalisées et simplement adsorbées sur des membranes diverses.

Les OMVs produites par *Legionella pneumophila* ont récemment été décrites comme étant impliquées dans le processus d'inhibition de la fusion entre les phagosomes et les lysosomes (Fernandez-Moreira et al., 2006). Comme *Brucella* parvient à dévier la voie endosomale classique pour établir sa niche répliquative, ces données nous autorisent à postuler que des OMVs produites par *Brucella* pourraient moduler le trafic intracellulaire, en adressant, par exemple, des composés bactériens à la cellule infectée. Nous avons donc tenté d'étudier l'internalisation des billes de latex dans les macrophages. Les mêmes techniques de fractionnement subcellulaire employées précédemment ont été exploitées. L'objectif était de mettre en évidence la colocalisation d'une fraction de la population des hydrolases lysosomales avec les billes phagocytées, pour les temps de contact et de chasse testés. Cependant, nous n'avons pas pu montrer d'association de ce type, avec cette technique. Ces expériences doivent, non seulement, être répétées car elles n'ont été réalisées qu'une seule fois, mais aussi complétées par des centrifugations isopycniques de cellules ayant phagocyté des billes pendant des périodes de contact et de chasse variables (de 30 minutes à 24 heures par exemple), afin d'établir une évolution au cours du temps de la distribution des billes dans les cellules. Une fois cette analyse réalisée, nous pourrions la comparer avec des conditions où les cellules sont mises en présence d'OMVs.

Lorsque des macrophages sont incubés en présence d'OMVs, ils semblent subir des modifications morphologiques. Nous avons donc incubé des OMVs sur les cellules Raw 264,7 pendant des temps de contact et de chasse croissants. Les cellules ont été, ensuite, observées au microscope à contraste de phase. Les macrophages forment, en effet, de plus en plus de prolongements cytoplasmiques lorsque les temps de chasse sont plus longs, ils semblent également être plus adhérents sur le substrat. De même, la taille des cellules paraît augmenter, contrairement à la densité de la population cellulaire. Aussi, après 20 heures de chasse, le cytoplasme paraît être plus granuleux. Comme les LPS semblent être un des composants majeurs des OMVs, nous avons voulu voir si l'effet des OMVs sur les cellules ne serait pas dû, totalement ou en partie, aux LPS. Nous avons essayé, autant que possible, de déposer sur les cellules une quantité de LPS purifiés qui correspond à la quantité de LPS amenés par les OMVs. Cependant, des fluctuations de la relation entre LPS et protéines, en fonction des échantillons, nous conduisent à émettre des réserves quant à la fiabilité de cette relation. Nous avons incubé des LPS sur les macrophages, pendant des périodes de temps identiques à celles testées avec les OMVs. Les changements morphologiques, même si ils sont observés, n'apparaissent pas avec la même cinétique, et ne semblent pas totalement identiques à ceux observés en présence d'OMVs. Il serait très intéressant d'imaginer que l'activité des LPS dépend de la manière dont ceux-ci sont présentés aux cellules, à savoir si ils sont présentés seuls ou portés par des OMVs.

Notons que ces observations semblent aller dans le sens d'un article dans lequel les auteurs travaillent avec des cellules Raw 264,7 ont été incubées avec des LPS d'*E. coli* (Saxena et al., 2003). Ils constatent des modifications morphologiques similaires, et caractérisent notamment l'augmentation de la taille des cellules, en présence de LPS d'*E. coli*, par cytométrie de flux. Aussi, ils ont noté, par l'utilisation de la même technique, l'apparition de marqueurs des cellules dendritiques en surface des cellules Raw 264,7 et par conséquent, les auteurs suggèrent une possible différenciation des cellules Raw 264,7 en cellules dendritiques. La confirmation de cette hypothèse nécessite cependant des études complémentaires car la différenciation de macrophages Raw 264,7 en cellules dendritiques paraît plutôt surprenante, étant donné que les cellules Raw 264,7 sont décrites comme étant

totale­ment différen­ciés (Saxena et al., 2003). Il serait, par consé­quent, très inté­ressant de repro­duire les expé­rien­ces de cet arti­cle, en les appli­quant à notre ma­té­riel, afin de voir si les mac­ro­phages Raw 264,7 répon­dent aux OMVs de *Brucella* de la même ma­nière qu'ils répon­dent aux LPS de *E. coli*.

Comme la protéine de membrane externe de *B. abortus* Omp 19 a été décrite comme pouvant intervenir dans la maturation des cellules dendritiques (Zwerdling et al., 2008), et que cette lipoprotéine est détec­tée dans les OMVs avec lesquels nous travaillons, il serait inté­ressant d'incuber des mac­ro­phages Raw 264,7 avec Omp 19, afin de voir si les modifications morphologiques apparaissent.

Toutefois, ces observations morphologiques résultent d'expériences uniques qui doivent, par consé­quent, être repro­duites. Il serait inté­ressant d'utiliser une approche en microscopie électronique (transmission et balayage) afin d'obtenir une analyse complémentaire et plus rigoureuse des modifications morphologiques que nous pensons observer.

Lorsque les mac­ro­phages Raw 264,7 sont incubés en présence d'OMVs de *Brucella*, nous constatons une diminution de la capacité de ces cellules à phagocyter des particules inertes. Il serait, dès lors, inté­ressant de tester l'effet des différents composants purifiés des OMVs tels que les Omps et les LPS, afin de, peut-être, identifier une implication de ces composants dans l'inhibition de la phagocytose.

Nous avons commencé par étudier l'effet de LPS purifiés sur la capture phagocytaire, et nous avons observé une diminution de la capacité phagocytaire des cellules Raw 264,7 lorsqu'elles sont incubées avec des LPS purifiés de *Brucella*. Rappelons qu'on ne pourra connaître précisément la contribution des LPS aux effets qu'on observe dans les expériences réalisées avec les OMVs, que lorsque nous pourrons répéter ce type d'expérience en utilisant une quantité de LPS libres correspondant fidèlement à la quantité de LPS amenés par les OMVs (voir page 56).

Comme les souches lisses et rugueuses de *Brucella* évoluent différemment dans les mac­ro­phages, il se pourrait que les OMVs issues des deux souches puissent également avoir un effet différent sur la phagocytose de particules inertes. Il serait donc inté­ressant de tester l'effet d'OMVs issues de souches rugueuses sur la capacité des mac­ro­phages à phagocyter les billes de latex.

De manière générale, une standardisation rigoureuse de la quantité de LPS amenés par les OMVs et de LPS purifiés sera, à l'avenir, nécessaire lorsque les effets des LPS et des OMVs seront testés lors d'expériences comparatives.

Ce projet laisse entrevoir de nombreuses perspectives, maintenant que nous avons établi le protocole de purification des OMVs, et que nous avons observé des effets biologiques de celles-ci sur les mac­ro­phages. Espérons qu'il puisse, à l'avenir, aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes mis en place par *Brucella* lors du processus infectieux.

Bibliographie

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.** (2002). Molecular biology of the cell, fourth edition. 746-757.
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzman-Verri, C., Chacon-Diaz, C., Rucavado, A., Moriyon, I. and Moreno, E.** (2007). Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One* **2**, e631.
- Bayer, M. E. and Anderson, T. F.** (1965). The surface structure of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**, 1592-9.
- Beaufays, H., Jacques, P., Baudhuin, P., Sellinger, O., Berthet, J. and de Duve, C.** (1964). Tissue fractionation studies. 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem J.* **92**, 184-205.
- Beveridge, T. J.** (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **181**, 4725-33.
- Bladen, H. A. and Waters, J. F.** (1963). Electron Microscopic Study of Some Strains of Bacteroides. *J Bacteriol* **86**, 1339-44.
- Boigegrain, R. A., Salhi, I., Alvarez-Martinez, M. T., Machold, J., Fedon, Y., Arpagaus, M., Weise, C., Rittig, M. and Rouot, B.** (2004). Release of periplasmic proteins of Brucella suis upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. *Infect Immun* **72**, 5693-703.
- Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W., Gidney, M. A., Meikle, P. J., Perry, M. B. and Peters, T.** (1989). Definition of Brucella A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect Immun* **57**, 2829-36.
- Callaghan, J., Simonsen, A., Gaullier, J. M., Toh, B. H. and Stenmark, H.** (1999). The endosome fusion regulator early-endosomal autoantigen 1 (EEA1) is a dimer. *Biochem J* **338** (Pt 2), 539-43.
- Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V. and Oliveira, S. C.** (2006). Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact* **5**, 13.
- Celli, J.** (2006). Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella. *Res Microbiol* **157**, 93-8.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. and Gorvel, J. P.** (2003). Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**, 545-56.
- Christie, P. J.** (2001). Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol* **40**, 294-305.
- Cloeckaert, A., de Wergifosse, P., Dubray, G. and Limet, J. N.** (1990). Identification of seven surface-exposed Brucella outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun* **58**, 3980-7.
- Cloeckaert, A., Jacques, I., Bosseray, N., Limet, J. N., Bowden, R., Dubray, G. and Plommet, M.** (1991). Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of Brucella. *J Med Microbiol* **34**, 175-80.
- Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., Dubray, G. and Limet, J. N.** (1993). Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough Brucella melitensis strain B115. *J Gen Microbiol* **139**, 1551-6.
- Corbel, M. J.** (2006). Brucellosis in human and animal. *World Health Organization*.

- Cutler, S. J., Whatmore, A. M. and Commander, N. J.** (2005). Brucellosis--new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol* **98**, 1270-81.
- de Duve, C., Pressman, B., Gianetto, R., Wattiauw, R. and Appelmans, F.** (1955). Tissue fraction studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* **60**, 604-617.
- Deatherage, B. L., Lara, J. C., Bergsbaken, T., Barrett, S. L., Lara, S. and Cookson, B. T.** (2009). Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol Microbiol.*
- Desjardins, M.** (1995). Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol* **5**, 183-6.
- Devoe, I. W. and Gilchrist, J. E.** (1973). Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* **138**, 1156-67.
- Dunne, D. W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M. and Joiner, K. A.** (1994). The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1863-7.
- Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P. and Warner, A.** (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* **172**, 1785-94.
- Fernandez-Moreira, E., Helbig, J. H. and Swanson, M. S.** (2006). Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect Immun* **74**, 3285-95.
- Forestier, C., Moreno, E., Pizarro-Cerda, J. and Gorvel, J. P.** (1999). Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an in vitro and in vivo study. *J Immunol* **162**, 6784-91.
- Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I. and Cloeckert, A.** (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2688-93.
- Furuta, N., Takeuchi, H. and Amano, A.** (2009). Entry of *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles into Epithelial Cells Causes Cellular Functional Impairment. *Infect Immun* **77**, 4761-70.
- Gamazo, C. and Moriyon, I.** (1987). Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect Immun* **55**, 609-15.
- Godfroid, J., Cloeckert, A., Liautard, J. P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B. and Letesson, J. J.** (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* **36**, 313-26.
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M. and Gruenberg, J.** (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-25.
- Gorvel, J. P. and Moreno, E.** (2002). *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* **90**, 281-97.
- Gorvel, J. P., Moreno, E. and Moriyon, I.** (2009). Is *Brucella* an enteric pathogen? *Nat Rev Microbiol* **7**, 250; author reply 250.
- Gu, F. and Gruenberg, J.** (1999). Biogenesis of transport intermediates in the endocytic pathway. *FEBS Lett* **452**, 61-6.
- Guzman-Verri, C., Chaves-Olarte, E., von Eichel-Streiber, C., Lopez-Goni, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J. P. and Moreno, E.** (2001). GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J Biol Chem* **276**, 44435-43.
- Ingram, J. M., Cheng, K. J. and Costerton, J. W.** (1973). Alkaline phosphatase of *Pseudomonas aeruginosa*: the mechanism of secretion and release of the enzyme from whole cells. *Can J Microbiol* **19**, 1407-15.

- Isberg, R. R., O'Connor, T. J. and Heidtman, M.** (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* **7**, 13-24.
- Janeway, C. A. and Travers, P.** (1996). Immunobiology. The immune system in health and disease.
- Kramnik, I. and Boyartchuk, V.** (2002). Immunity to intracellular pathogens as a complex genetic trait. *Curr Opin Microbiol* **5**, 111-7.
- Kuehn, M. J. and Kesty, N. C.** (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* **19**, 2645-55.
- Kuronita, T., Eskelinen, E. L., Fujita, H., Saftig, P., Himeno, M. and Tanaka, Y.** (2002). A role for the lysosomal membrane protein LAMP2 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J Cell Sci* **115**, 4117-31.
- Kwiatkowska, K. and Sobota, A.** (1999). Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays* **21**, 422-31.
- Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., Tian, M., Kearney, P., Hamaidi, L., Chelsky, D. et al.** (2007). Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res* **6**, 1519-29.
- Lee, C. H. and Tsai, C. M.** (1999). Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation. *Anal Biochem* **267**, 161-8.
- Lee, E. Y., Bang, J. Y., Park, G. W., Choi, D. S., Kang, J. S., Kim, H. J., Park, K. S., Lee, J. O., Kim, Y. K., Kwon, K. H. et al.** (2007). Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics* **7**, 3143-53.
- Lee, E. Y., Choi, D. S., Kim, K. P. and Gho, Y. S.** (2008). Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev* **27**, 535-55.
- Lemmon, S. K. and Traub, L. M.** (2000). Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 457-66.
- Lindsay, S. S., Wheeler, B., Sanderson, K. E., Costerton, J. W. and Cheng, K. J.** (1973). The release of alkaline phosphatase and of lipopolysaccharide during the growth of rough and smooth strains of *Salmonella typhimurium*. *Can J Microbiol* **19**, 335-43.
- Manterola, L., Guzman-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Barquero-Calvo, E., de Miguel, M. J., Moriyon, I., Grillo, M. J., Lopez-Goni, I. and Moreno, E.** (2007). BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infect Immun* **75**, 4867-74.
- Manterola, L., Moriyon, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D. S., Koch, M. H., Howe, J., Brandenburg, K. and Lopez-Goni, I.** (2005). The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J Bacteriol* **187**, 5631-9.
- Mashburn-Warren, L. M. and Whiteley, M.** (2006). Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol* **61**, 839-46.
- Moreno, E. and Moriyon, I.** (2001). The genus *Brucella*. *Electronic version*.
- Moreno, E., Pitt, M. W., Jones, L. M., Schurig, G. G. and Berman, D. T.** (1979). Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **138**, 361-9.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. and Mayer, H.** (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* **172**, 3569-76.
- Mu, F. T., Callaghan, J. M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R. G., Campbell, P. L., McCluskey, J., Yeo, J. P., Tock, E. P. and Toh, B. H.** (1995). EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane

protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* **270**, 13503-11.

Mukherjee, S., Ghosh, R. N. and Maxfield, F. R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev* **77**, 759-803.

Naroeni, A. and Porte, F. (2002). Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun* **70**, 1640-4.

Necchi, V., Candusso, M. E., Tava, F., Luinetti, O., Ventura, U., Fiocca, R., Ricci, V. and Solcia, E. (2007). Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **132**, 1009-23.

Osterman, B. and Moriyon, I. (2006). International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1173-1175.

Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L. and Akritidis, N. (2006). *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2229-36.

Pitt, A., Mayorga, L. S., Stahl, P. D. and Schwartz, A. L. (1992). Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest* **90**, 1978-83.

Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R. G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. and Gorvel, J. P. (1998). *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* **66**, 5711-24.

Pollard, T. and Earnshaw, W. (2004). Cell biology. 355-367.

Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S. and Liautard, J. P. (2003). Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun* **71**, 1481-90.

Prescott, M. L., Harley, P. J. and D., K. A. (2007). Microbiologie, 2e édition française, De Boeck Université. 58-59, 598-802.

Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* **5**, 85-7.

Rittig, M. G., Kaufmann, A., Robins, A., Shaw, B., Sprenger, H., Gems, D., Foulongne, V., Rouot, B. and Dornand, J. (2003). Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J Leukoc Biol* **74**, 1045-55.

Roop, R. M., 2nd, Bellaire, B. H., Valderas, M. W. and Cardelli, J. A. (2004). Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol Microbiol* **52**, 621-30.

Saftig, P. and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 623-35.

Saxena, R. K., Vallyathan, V. and Lewis, D. M. (2003). Evidence for lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic like cells. *J Biosci* **28**, 129-34.

Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedlacek, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kampfer, P., Neubauer, H., Cloeckert, A. et al. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 375-82.

Schooling, S. R. and Beveridge, T. J. (2006). Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* **188**, 5945-57.

Shepard, C. C. (1958). Nonacid-fast bacteria and HeLa cells: Their uptake and their subsequent intracellular growth. *J Bacteriol.* **77**, 701-714.

Smith, L. D. and Ficht, T. A. (1990). Pathogenesis of *Brucella*. *Crit Rev Microbiol* **17**, 209-30.

Starr, T., Ng, T. W., Wehrly, T. D., Knodler, L. A. and Celli, J. (2008). Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* **9**, 678-94.

Thilo, L., Stroud, E. and Haylett, T. (1995). Maturation of early endosomes and vesicular traffic to lysosomes in relation to membrane recycling. *J Cell Sci* **108** (Pt 4), 1791-803.

Thomas, C. A., Li, Y., Kodama, T., Suzuki, H., Silverstein, S. C. and El Khoury, J. (2000). Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J Exp Med* **191**, 147-56.

Vieira, O. V., Botelho, R. J. and Grinstein, S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* **366**, 689-704.

Zwerdling, A., Delpino, M. V., Barrionuevo, P., Cassataro, J., Pasquevich, K. A., Garcia Samartino, C., Fossati, C. A. and Giambartolomei, G. H. (2008). Brucella lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by Brucella abortus. *Microbes Infect* **10**, 1346-54.